

DER EINFLUSS HOHER TEMPERATUREN
AUF DIE PROTEINE
GEFRIERGETROCKNETER FRAUENMILCH

VON

KONRAD STEINHEUER

1959

Aus der Universitäts-Frauenklinik Mainz

Direktor: Professor Dr. H. Schwalm

DER EINFLUSS HOHER TEMPERATUREN
AUF DIE PROTEINE
GEFRIERGETROCKNETER FRAUENMILCH

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

KONRAD STEINHEUER

approbierter Arzt

Oberemmel Kreis Saarburg

MAINZ

1959



Referent: Priv.-Doz. Dr. Friedberg

Korreferent: Prof. Dr. Schwalm

Dekan: Prof. Dr. Leicher

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Dezember 1959

Datum des Diploms - 2. DEZ. 1959

DISPOSITION

- A) Einleitung und Standortbestimmung
- B) Problemendarstellung
- C) Experimenteller Teil
 - I. Grobe Beobachtung - orientierende Versuche
 - II. Papierelektrophoretische Untersuchungen
 - Methodik
 - Untersuchungen mit "gereinigter Magermilch"
 - Untersuchungen mit "Milchserum eigener Herstellung"
 - Ergebnisse
 - Zusammenfassung und Diskussion
 - III. Vergleichende Fermentuntersuchungen
 - A. Orientierende Untersuchungen an der Katalase
 - B. Vergleichende Prüfungen der alkalischen Phosphataseaktivität
 - 1. Der Aufbau der Phosphatasebestimmungsmethode.
 - Studien zur Methodik
 - a) Die Originalmethode nach GIRI
 - b) Kolorimetrische Bestimmung der Phosphorsäure nach LOHMANN und JENDRASSIK
 - c) Das Versagen der Eiweißfällung
 - d) Die Eiweißfällung mit Molybdatreagenz, Fällungsmechanismus
 - e) Konsequenzen
 - f) Die Photometrie am Eppendorf-Gerät
 - g) Begriffe
 - h) Maß der Fermentaktivität (Eichkurve)
 - i) Nachteile und Ungenauigkeiten bei Versuchen mit Vollmilch allein
 - k) Die verschiedenen Zustandsformen im Vergleich nach Präparation von Magermilch
 - l) Aktivierungsprobleme und Experimente (totale Aktivierung) Butanol - Aceton - Chloroform
 - m) Die präparativen Maßnahmen im Zusammenhang, die zur Durchführung eines Chargenversuches notwendig sind. - Herstellung des Milchserums
 - n) Der Reaktionsansatz
 - o) Die Verarbeitung der Rückstände zwecks Überprüfung der Restaktivität und des Restgehaltes an wasserlöslichen Proteinen

2. Studien zum Verlauf der Phosphatasereaktion -
Gemoetrische Analyse - Wolframfällung - Konsequenzen
für die Verfahrensweise
3. Ergebnisse
4. Zusammenfassung und Diskussion

C. Fermente des intermediären Stoffwechsels

Einleitung

1. Die vergleichende Bestimmung der Milchsäuredehydro-
genase-Aktivität in den drei Zustandsformen der Frauen-
milch N, T und T3
Methodik
2. Die vergleichende Bestimmung der Glutaminsäure-Oxal-
essigsäure-Transaminase-Aktivität in den drei Zustands-
formen der Frauenmilch N, T und T3
Methodik
3. Diskussion der Ergebnisse
4. Die mathematische Erfassung eines Reaktionsverlaufs zur
Bestimmung des Endpunktes der Vorreaktionen (Startpunkt
der GOT-Reaktion)

IV. Bakteriologische Tests

1. Orientierende Untersuchungen
2. Diskussion

D) Schlußbetrachtung und Zusammenfassung

E) Abbildungen

F) Literaturverzeichnis

A) EINLEITUNG UND STANDORTBESTIMMUNG

In der Säuglingsernährung spielt auch heute noch die Frauenmilch ihre dominierende Rolle. Wenn auch mit zunehmender Besserung der sozialen Verhältnisse, die in unserer Zeit eines wirtschaftlichen Aufschwungs immer breitere Bevölkerungsschichten erfaßt, bei gleichzeitigem Aufgebot hochwertiger künstlicher Säuglingsnährmittel durch die Industrie die Stillfreudigkeit ständig im Abnehmen begriffen ist (diese Tatsache ist wohl allgemein bekannt), so kann dies an der überragenden Bedeutung der Frauenmilch für die Ernährung des Säuglings grundsätzlich nichts ändern. Die Existenz hochwertiger künstlicher Nahrungsgemische ist vom Standpunkt des Pädiaters durchaus wünschenswert. Ihre Entwicklung war jahrzehntelang das vordringliche Anliegen pädiatrischer Forschung, und ein Verzicht auf diese Art der Säuglingsernährung ist heute kaum mehr denkbar. Zahllose Kinder stillunfähiger oder hypogalaktischer Mütter verdanken der Möglichkeit künstlicher Ernährung ihr Leben. Mit der künstlichen Ernährung wird aber ein Gesundheitszustand erreicht, der einer Brustkindeutrophie ähnlich, aber nicht gleichzusetzen ist (1). Differenzen in den Auswirkungen der verschiedenen Ernährungsformen ergeben sich vor allem aus der verschiedenen Zusammensetzung der natürlichen und künstlichen Nahrung. Die Frauenmilch ist nicht nur Nahrungsmittel; sie ist hinsichtlich ihrer biologischen Wertigkeit unersetzlich. Ihre Anwendung wird beispielsweise zwingend und ist klinisch indiziert, wenn die zu ernährenden Kinder Frühgeborene sind, wenn eine Dekomposition, eine Atrophie und Dystrophie, eine Abstilldyspepsie oder eine Dysergie (z.B. bei Infektionserkrankungen oder operativen Eingriffen) vorliegt.

Der Bedarf an Frauenmilch bleibt vorerst bestehen. Seit dem Rückgang des Ammenwesens mit dem I. Weltkrieg bereitet ihre Beschaffung ständig größer werdende Schwierigkeiten. Die Milch kann praktisch nur noch von gesunden stillenden Frauen mit überschüssiger Milch bezogen werden. Mit dem Wunsche und der Notwendigkeit, ständig einen Vorrat an Frauenmilch bereit zu haben, tauchte die Idee der Einrichtung von Frauenmilchsammelstellen auf. 1907 richtete MAYERHOFER (2) in der Prager Kinderklinik die erste Frauenmilchsammelstelle ein. Später wurde diese Idee von Marie-Luise KAYSER (3) in Deutschland eifrig propagiert. Heute sind Frauenmilchsammelstellen in vielen Ländern der Welt Wirklichkeit geworden und entfalten ihre segensreiche Tätigkeit teils in Verbindung mit Kinderkliniken, z. T. aber auch als selbständige Unternehmungen.

Der Geschichte der Frauenmilchsammelstellen haftet seit den ersten Bemühungen um die Anlage von Frauenmilchvorräten das leidige Problem ihrer Konservierungsmöglichkeiten an (4). Sieht man von der selbstverständlichen Forderung nach einer von pathogenen Keimen freien Milch ab - *Escherichia coli*, Staphylokokken, Streptokokken, Keime der Salmonella-Gruppe (Typhus), *Mycobacterium tuberculosis* und *Spirochaeta pallida* -, so bleibt die Besiedlung der Frauenmilch mit physiologischerweise vorkommenden Keimen immer noch ein Problem für die Haltbarkeit von Frauenmilchvorräten. Die Qualität allein ist nicht entscheidend für die Haltbarkeit einer Milch, sondern auch die Zahl der apathogenen Keime, insofern als die zur gewöhnlichen Mikroflora der Frauenmilch gehörenden, an sich unschädlichen Keime infolge ihrer Stoffwechseltätigkeit einen Milchvorrat so verändern können, daß er für die Ernährung ausscheidet. Zu dieser Gruppe von Keimen gehören: *Tetracoccus liquefaciens* (Mammakokken), *Streptococcus lactis et cremoris*, *Thermobacterium intestinale*, *Bact. acidophilum*, seltener *Bact. prodigiosum fluorescens* und Sporenbildner,

Eine ideale Forderung an ein Verfahren zur Konservierung von Nahrungsmitteln ist die Erreichung absoluter Keimfreiheit bei Erhaltung der biologischen Wirksamkeit und der physikalischen und chemischen Eigenschaften von Eiweißkörpern, Kohlehydraten und Fetten als auch von Wirkstoffen, mikromolekularen Substanzen und Mineralien im konservierten Gut; eine weitere Vermehrung der im konservierten Nahrungsmittel befindlichen Keime darf nicht stattfinden; das Nahrungsmittel muß lange lagerungsfähig sein; es muß genießbar sein und darf keine schädlichen Zusätze enthalten; es muß vereinfacht und ohne Umstände transportfähig sein; das Konservierungsverfahren muß praktisch durchführbar und wirtschaftlich rentabel sein (5). Auf die Konservierung von Frauenmilch angewendet, bedeutet dies, daß es bis heute kein Konservierungsverfahren gibt, welches den genannten Forderungen genügt. Die bisher geübten und z. T. wieder aufgegebenen Verfahren zeigen bei kritischer Betrachtung, daß jedes dieser Verfahren unter dem Gesichtspunkt der aufgestellten Idealforderung einen mehr oder weniger gelungenen Kompromiß zwischen den hygienischen und ernährungsphysiologischen und praktischen Erfordernissen darstellt. Es gibt bisher kein Verfahren, dessen Vorzüge nicht mit Nachteiligkeiten im Sinne der Idealforderung "belastet" wären.

Die einzelnen Verfahren:

1. Entkeimung und Haltbarmachung durch Erhitzen

a) Kochen bei 100° C für die Dauer von 5-10-15 min (CATEL)

- b) Pasteurisieren bei 62-65° C für die Dauer von 1/2 h (6)
 - c) Kurzzeiterhitzung bei 71-74° C für die Dauer von 45 sec und Hoche-
hitzung bei 85° C für die Dauer von 15 sec, beide Methoden gebräuch-
lich im Molkereiwesen.
 - d) Kurzes Aufkochen, 100° C, bis zum Aufschäumen der Milch, die ein-
fachste und beste, in Deutschland gebräuchlichste Methode der Konser-
vierung von Frauenmilch durch Erhitzen (7)
2. Herstellung von Trockenpulvern
- a) Vakuum-Walzenverfahren (8)
 - b) Zerstäubungsverfahren (Heißluft von 100-200° C, im Trockenfeld
Temperatur von 40° C infolge Verdunstung (7))
 - c) Vakuumtrocknung (9)
3. Rohkonservierung von Frauenmilch
- a) Wasserstoffsuperoxyd-Zusatz (2)
 - b) durch Kälte (SCHLOSSMANN, A., CATEL u. ZENKER (10)), Tiefkühl-
verfahren bei -20° C (FREUDENBERG, Martin DU PAN, KELLER, loc.
cit. (10))
 - c) durch Säuerung mit Milchsäure (ADAM, loc.cit.(11)), mit Citronen-
säure (CATEL, ROOS u. KINDLER, ROOS, RUSS, H. THOMAS, DRESEL,
loc.cit. (11))
 - d) durch Zusatz von Antibiotica: Streptomycin (LINNEWEH, MARGET,
ARNOLD, POETSCHKE, BINDEWALD, ROOS u. KINDLER, H. THOMAS,
loc.cit. (12)); Aureomycin (EISLEB, OCKLITZ u. SCHMIDT, loc.cit.
(13))
 - e) mit Ultra-Violettlicht-Bestrahlung (FREUDENBERG, SPRÖSSIG, K. KAY-
SER, loc.cit. (14))
 - f) durch Gefriertrocknung (FLOSDORF u. MUDD, loc.cit. (15))

Seitdem CATEL 1930 aufgrund ausgedehnter Untersuchungen im Tierexperi-
ment und klinischer Untersuchungen an Säuglingen in Verbindung mit Stoff-
wechseluntersuchungen den Begriff des Sterilisationsschadens infolge Erhitzens
von roher Frauenmilch geprägt und erhärtet hat (16-20) und in seinen gewon-
nenen Erkenntnissen die Unterstützung und Bestätigung durch zahlreiche Auto-
ren gefunden hat (21-31), angefangen von den ersten Untersuchungen von
FINKELSTEIN (32), der bereits 1907 die Überlegenheit der rohen Frauenmilch
über die abgekochte feststellte, hat es an intensiven Bemühungen um ein
brauchbares Verfahren zur Rohkonservierung von Frauenmilch nicht
gefehlt. Von den genannten Verfahren sind heute nur noch die Konservierung

durch Tiefkühlung und die Gefriertrocknung als Verfahren zur Rohkonservierung von Frauenmilch diskutabel.

Demgegenüber steht die große Gruppe von Autoren, die auch heute noch die Entkeimung der Frauenmilch durch Erhitzen als ein Verfahren ansehen, das jedem anderen Konservierungsverfahren überlegen ist. Diese konnten sich von einem Sterilisationsschaden bei den von ihnen ernährten Säuglingen und Frühgeburten durch Erhitzen der Frauenmilch nicht überzeugen (33-39). Einen Überblick über den neuesten Stand der Anschauungen über den Wert der Frauenmilchkonservierungsverfahren bietet der Bericht über die Arbeitstagung der Leiter und Leiterinnen von Frauenmilchsammelstellen in Essen am 17./18. Mai 1958. Dem Bericht ist mit aller Deutlichkeit zu entnehmen, daß die Hitzesterilisierung, besonders die "Kurzzeiterhitzung", womit das kurze Aufkochen gemeint ist, gegenüber früheren Anschauungen mit großer Übereinstimmung als die Methode der Wahl für eine Entkeimung von Frauenmilch anzusehen ist. Hervorgehoben wird vor allem die Zuverlässigkeit im Entkeimungseffekt und Unschädlichkeit bei der Ernährung von Frühgeburten und Säuglingen mit erhitzter Frauenmilch sowie die breite Anwendbarkeit des Verfahrens und die damit verbundene fast 100%ige Ausbeute des zu konservierenden Gutes. Durch umfangreiche und in ihren Ergebnissen überzeugende vergleichende Untersuchungen - Fütterungsversuche (SAUERBREI-Essen, ESSIGKE-Jena, KARTE-Göttingen), Stoffwechseluntersuchungen (HOFFMANN-Essen) - wird praktisch alles widerlegt, was gegen eine Erhitzung von Frauenmilch gesagt werden kann. Die in Laboratoriumsversuchen nachweisbare Überlegenheit der Rohmilch bleibt - cum grano salis - für die Ernährung bedeutungslos, da sich signifikante Unterschiede gegenüber den Aufzuchtserfolgen bei Ernährung mit gekochter Muttermilch nicht ergeben. Die CATEL'schen Untersuchungen beziehen sich auf Frauenmilch, die 10-15 min gekocht war, und lassen sich mit den neueren Untersuchungen nicht mehr vergleichen. Die zwingende Notwendigkeit der Erhaltung des Rohmilchcharakters bei Anwendung eines Konservierungsverfahrens kann demzufolge nicht mehr als berechtigt angesprochen werden und wird energisch bestritten.

Die Frage, die heute zur Diskussion steht, kommt in der Alternative Denaturierung durch Erhitzen oder bakterielle Gefahr durch Rohmilchkonservierung zum Ausdruck. Die Denaturierung durch Erhitzen von Nativmilch scheint für die Verdaulichkeit und die Nahrungsverwertung bedeutungslos zu sein. Die größere Gefahr droht jedenfalls immer vonseiten der Bakterien, die lebend in den Säuglingsorganismus gelangen. Verunreinigungen durch Endotoxine, die größtenteils hitzestabil sind und nach Vernichtung der Keime frei werden,

sowie durch andere Stoffwechselprodukte der Bakterien scheinen ohne schädigende Wirkung bei peroraler Zufuhr hochgradig verunreinigter, abgekochter Frauenmilch zu bleiben (FELDWEG-Pforzheim u. EISLEB-Gotha). Spezielle Arbeiten zu diesen Fragen liegen jedoch nicht vor. Es sei an dieser Stelle die Bemerkung KARTE's-Göttingen wiederholt, daß die Diskussion über den Wert oder Unwert erhitzter Frauenmilch ein Problem zu sein scheint, das ausschließlich deutsche Autoren beschäftigt. In der Weltliteratur habe er Beiträge zu diesem Thema nicht finden können.

Aufgrund seiner nachteiligen Erfahrungen mit hitzesterilisierter Frauenmilch forderte CATEL mit allem Nachdruck die Entwicklung eines brauchbaren und zuverlässigen Verfahrens zur Rohkonservierung von Frauenmilch. Nachdem FLOSDORF und MUDD 1935 erstmalig Frauenmilch dem Gefriertrocknungsverfahren unterworfen hatten, ohne daß sich daraus Konsequenzen für eine routinemäßige Anwendung dieses Verfahrens auf die Frauenmilchkonservierung ergaben, griff CATEL dieses Verfahren erneut auf, weil er in der Methode der Gefriertrocknung eine Möglichkeit sah, die von ihm geforderte Rohkonservierung von Frauenmilch zu verwirklichen (40). 1953 gaben CATEL, PENDL und SCHIFF ihre Erfahrungen mit der Gefriertrocknung von Frauenmilch bekannt (41). Mit Ausnahme des Vitamin A, welches eine Einbuße von 17-38% erlitt, fanden sie die untersuchten biologischen Wirkstoffe - Inhibine, Vitamine und Fermente - nach Ablauf des Gefriertrocknungsprozesses praktisch unverändert in der Milch wieder. Der Test am Säugling stand noch aus. KÖTTGEN, BRAUN und FRIEDBERG (42) konnten 1953 zum ersten Mal in einem vergleichenden Ernährungsversuch an 6 Frühgeborenen die Gleichwertigkeit keimarmer gefriergetrockneter Frauenmilch und frischer roher Frauenmilch beweisen. Elektrophoretische Untersuchungen ließen keinen Unterschied zwischen den Proteinen der Nativmilch und denen der gefriergetrockneten Milch erkennen. Bakteriologische Untersuchungen erbrachten das Phänomen einer Keimreduktion durch den Vorgang der Gefriertrocknung und Lagerung der Trockenmilch bei Zimmertemperatur über 4 Wochen. Eine Keimvermehrung im getrockneten Material konnte nicht beobachtet werden.

Mit diesen ersten Untersuchungen war der Weg freigegeben, weitere experimentelle Erfahrungen unter Berücksichtigung physikalisch-chemischer, bakteriologischer, klinischer und rein praktischer Fragen zu sammeln.

Die Ergebnisse seiner jahrelangen, mühevollen Forschungsarbeit über den Vergleich gefriergetrockneter mit roher Frauenmilch, mit detaillierten Experimenten zur Methode der Gefriertrocknung selbst (verschiedene Verfahrensbe-

dingungen), über Eigenschaften des Trockengutes, qualitative Veränderungen infolge Gefriertrocknung und einem systematischen Studium des Phänomens der Keimreduktion durch das Trockenverfahren und anschließende Lagerung hat C. A. SAGER-Kiel in einer umfangreichen, kürzlich erschienenen Monographie zusammengestellt (43). Die wichtigsten Daten seien hier wiedergegeben:

Unter genauer Beachtung der erarbeiteten methodischen Bedingungen soll nach 12 Std. bei 5×10^{-2} Torr ein optimaler Restfeuchtigkeitsgehalt von 4-5% im Trockengut erreicht werden. Bei dieser Manipulation und einer anschließenden Lagerung bei Zimmertemperatur unter atmosphärischer Luft in einfachen, mit Gummistopfen verschlossenen Säuglingsflaschen, wird das Frauenmilchprotein qualitativ und quantitativ kaum verändert. Die in der Frauenmilch vorkommenden Fermente behalten weitgehend ihre Wirksamkeit; die Amylase wird in ihrer Aktivität durch die Gefriertrocknung nicht betroffen, die sehr empfindliche Lipase erleidet eine Einbuße von durchschnittlich 15% - von den Vitaminen erleidet das Vitamin C einen Verlust von durchschnittlich 20%, das Vitamin A einen solchen von 30%. Die Vitamine B₂ und B₁₂ bleiben unverändert - Hämagglutinine und Inhibine werden von der Gefriertrocknung wenig berührt.

Sehr gute Haltbarkeit des gefriergetrockneten Frauenmilchpulvers. Die empfindlichen Fermente sind nach zwei Monaten Aufbewahrung noch aktiv. Die Amylase ist vollwirksam, die Lipase in ihrer Wirksamkeit um 30 bis 40% geschwächt, die Inhibine zeigen nur eine geringe Beeinträchtigung ihrer Kraft. Vom Vitamin C ist nach 2 Monaten noch durchschnittlich die Hälfte vorhanden. - Bei der Überprüfung der Haltbarkeit des Fettes wurde vereinzelt eine leichte Oxydation der ungesättigten Fettsäuren, die sich als "Talgigwerden" bemerkbar macht, festgestellt. Oxydation und Hydrolyse von Fett, unter dem Begriff "Ranzigwerden" bekannt, werden selbst nach 2-jähriger Lagerzeit nicht beobachtet. - Die Reemulgierung des Fettes bei der Wiederauflösung bereitete keine Schwierigkeiten. Das Aufrahmungsvermögen der gefriergetrockneten und 3 Monate lang gelagerten Milch ist unverändert erhalten. Während der Lagerung treten keine Veränderungen des Milchzuckergehaltes und des Säuregrades in den getrockneten Frauenmilchproben ein. Eine Vermehrung der in der Frauenmilch befindlichen Keime findet nicht statt. Während des Gefriertrocknungsprozesses selbst und bei der Lagerungsperiode erfolgt eine umfangreiche Keimzahlverminderung. Die Absterbequote beläuft sich während des Gefriertrocknungsvorganges durchschnittlich auf 70-80%; nach einer Aufbewahrungszeit von 4 Wochen beträgt die Überlebensrate weniger als 1%

des Ausgangswertes. Kokken zeigen gegenüber der Gefriertrocknung eine größere Widerstandskraft als stäbchenförmige Keime (*E. coli commune*). Die vegetativen Formen der Sporenbildner (*Bact. subtilis*) werden genau so geschädigt wie andere in der Milch vorkommende Erreger. Die Sporen verlieren dagegen ihre Auskeimungsfähigkeit nicht. - Das Vermehrungsvermögen der Gefriertrocknung überlebenden Bakterien (Generationsdauer) ist im Vergleich zu nicht gefriergetrockneten Milchkeimen beeinträchtigt.

Abweichungen von der beschriebenen Methodik beeinflussen sowohl die Haltbarkeit der empfindlichen Bestandteile der Milch als auch den Grad der Keimzahlverminderung.

1. Eine Verkürzung des Trockenvorganges, die einen höheren Restfeuchtigkeitsgehalt des Trockengutes nach sich zieht, führt zu einer Beschleunigung der Keimreduktion, aber auch zu einer Herabsetzung der Funktionstüchtigkeit der empfindlichen biologischen Eigenschaften (Fermentaktivitätsverlust, Vitaminverluste). - Bei niedrigen Restfeuchtigkeitswerten (unter 5%) geht der Keimzahlabfall langsamer vor sich. Die Überlebensrate beträgt bei Restfeuchtigkeitswerten um 0,5% nach 2 Wochen 30%, bei einem Restwassergehalt von 4,5% nach 2 Wochen 5%. Die biologischen Eigenschaften verlieren jedoch nur um 15-25% an Aktivität.

2. Bei niedrigen Aufbewahrungstemperaturen von 4° C beträgt die Verminderung der Keimzahl innerhalb von 2 Wochen 80%. Bei 20° C beträgt die Verminderung 95%, bei 37° C ist nur noch eine Überlebensrate von 1% vorhanden. Lipase und Vitamin C sind bei 4° und 20° gleich gut haltbar, bei 37° Aufbewahrungstemperatur findet innerhalb von 2 Wochen ein Verlust von 20-35% statt.

Der günstigste Restfeuchtigkeitsgrad liegt um 5%, die günstigste Aufbewahrungstemperatur bei 20°. Bei diesen mittleren Werten macht sich die Schädigung der biologischen Eigenschaften erst in geringem, die Keimzahlverminderung bereits in erheblichem Maße bemerkbar. Unter diesen Bedingungen wird nach einer Lagerzeit von 2-4 Wochen ein für den Verbraucher nicht mehr schädlicher Keimgehalt erreicht (Fälle hochgradig verunreinigter Milch mit Keimzahlen über 5 Mill./ml scheiden aus). Dagegen beträgt zu diesem Zeitpunkt der Aktivitätsverlust der empfindlichen biologischen Wirkstoffe (Lipase und Vitamin C) höchstens bis zu 30%, das Milchprotein weist keinerlei Beeinflussung auf.

Damit wurde mit der Gefriertrocknung der Frauenmilch ein Verfahren - zumin-

dest die Bedingungen zu einem Verfahren - zur Konservierung entwickelt, das unter den geschilderten experimentell erarbeiteten Bedingungen den Anforderungen gerecht wird, die an ein schonendes Konservierungsverfahren gestellt werden müssen. Die Gefriertrocknung gewährleistet: 1. Die Erhaltung der nativen Eigenschaften der Frauenmilch, 2. Entkeimung oder an eine Entkeimung heranreichende Keimverminderung, 3. Lagerfähigkeit, 4. vereinfachte Versandfähigkeit.

An der Universitäts-Frauenklinik in Mainz konnten seit der Publikation von KÖTTGEN, BRAUN und FRIEDBERG (1955) mit Hilfe einer größeren Gefriertrocknungsanlage mit einer maximalen Tageskapazität von 3 Litern ausreichende praktische Erfahrungen mit der Gefriertrocknung als Verfahren zur Konservierung von Frauenmilch gesammelt werden, die eine umfassende Bewertung des Verfahrens erlauben. In einer noch unveröffentlichten Arbeit von FRIEDBERG und STEINHEUER (DMW) (75) werden diese Erfahrungen mit den daraus zu fordernden Konsequenzen für die Anwendbarkeit des Verfahrens wiedergegeben. Demzufolge kann in der Praxis der von SAGER beschriebene, dem Pasteurisierungseffekt gleichkommende Entkeimungseffekt durch Gefriertrocknung und Lagerung nicht erwartet werden. Zwar tritt durch den Gefriertrocknungsvorgang eine Keimreduktion bis zu einer Überlebensrate von 20 bis 40% ein, die weitere Lagerung des Trockengutes bringt aber keine wesentliche Keimzahlverminderung mehr mit sich. Eine Absterbequote von 99%, wie sie SAGER bei einem Restfeuchtigkeitsgehalt von ca. 5% nach 4-wöchiger Lagerung regelmäßig finden konnte, ließ sich aber in keinem Fall nachweisen. In diesem Umstand ist der Hauptnachteil dieses Konservierungsverfahrens zu sehen. Alle anderen Vorzüge können nur auf das Nachhaltigste bestätigt werden, z.B.

1. Ausgezeichnete Verträglichkeit der Trockenmilch, die ernährungsmäßig keinen Unterschied zur frischen, rohen Frauenmilch erkennen läßt,
2. ausgezeichnete Lagerungsfähigkeit (Haltbarkeit) ohne nennenswerte Veränderungen ihrer biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften,
3. Erhaltung der Rohmilch-Eigenschaften,
4. vereinfachte Versandfähigkeit infolge Temperaturunempfindlichkeit über große Strecken,
5. leichte Handhabung des Trockengutes ohne besondere Vorkenntnisse im Haushalt.

Der unzureichende Entkeimungseffekt bei der Gefriertrocknung und bei der anschließenden Lagerung der getrockneten Frauenmilch zieht einschneidende, die Praxis der Gefriertrocknung in breiter Anwendung belastende Konsequenzen nach sich. Bei bakteriell stark verunreinigter Milch (Höchstgrenze des zulässigen Keimgehaltes: 50 000 Keime m/l) bleibt der Keimgehalt des wiederaufgelösten Trockengutes zu hoch, um sie als Säuglingsnahrung in die freie Praxis abgeben zu können. Die Gefriertrocknung bleibt daher ein Ausleseverfahren, bei dem eine gewissenhafte Sichtung der eingegangenen Rohmilch notwendig ist. Als Folge der strengen Anforderungen, die an die anfallende Rohmilch in hygienischer Hinsicht zu stellen sind, liegt die Verwertbarkeit durch Gefriertrocknung und anschließende Lagerung bei einem Durchschnitt von nur 40%. Dieser Prozentsatz sinkt in warmen Jahreszeiten noch tiefer, zu Zeiten, in denen der Bedarf an Trockenmilch durch Verbraucher erfahrungsgemäß am stärksten ist. Die größte Schwierigkeit bei dieser Form der Konservierung liegt also bisher darin, eine möglichst keimarme Rohmilch zu erhalten. Trotz erheblicher organisatorischer Anstrengungen läßt sich der Prozentsatz der durch Gefriertrocknung verwertbaren Rohmilch kaum mehr heben. Bei 60% der gesammelten Milch lag die Keimzahl über der festgesetzten Grenze von 50 000 Keimen/ml.

Der Widerspruch, der sich aus den verschiedenen Anschauungen über den Erfolg der Entkeimung durch Lagerung gefriergetrockneter Frauenmilch ergibt, erweist sich bei näherer Betrachtung der Sachlage als eine vollständige Übereinstimmung der Erfahrungen. Der von SAGER entdeckten gesetzmäßigen Abhängigkeit von Keimreduktion und Restfeuchtigkeit kann nicht widersprochen werden. Diese Gesetzmäßigkeit indes liefert den Schlüssel zum Verständnis des Zusammenhanges zwischen den verschiedenen Ergebnissen. Wie verschiedene Überprüfungen des Restfeuchtigkeitsgehaltes in den von der Mainzer Anlage gelieferten Trockenmilchproben zeigen, wird im Endzustand ein Restfeuchtigkeitsgehalt von 0,5-3% erreicht. Unter solchen Bedingungen wird die verminderte Keimreduktion erklärlich, und im Vergleich mit den SAGER'schen Befunden bei gleichem Restwassergehalt findet sich eine genügend exakte Übereinstimmung.

Das systematische Studium der Gesetzmäßigkeit zwischen Restwasser und Absterbequote der Keime im Trockengut wurde von SAGER auf einem analytischen Wege aufgeklärt, der eine praktisch-technische Konsequenz bezüglich der Einhaltung eines Restwasseroptimums von 4-5% nicht oder kaum zuläßt. Die Ergebnisse sind in der Weise gewonnen worden, daß der Gefriertrocknungsprozeß mit fortschreitender Zeit in der Nachtrocknungsperiode für einzelne Proben un-

terbrochen worden ist, zumal dem ermittelten Restwassergehalt bestimmte bakteriologische und biochemische Ergebnisse zugeordnet werden konnten. Die praktische Folgerung wäre notwendigerweise die Umkehr dieses Verfahrens, was zu einer zuverlässigen Beobachtungsmöglichkeit des Wassergehaltes während des laufenden Trocknungsprozesses führen müßte. Eine technische Möglichkeit, diesen Faktor direkt zu erfassen, gibt es aber bis heute nicht. Zweifellos lassen sich für kleinere Anlagen mit kleinen Proben exakte Bedingungen für ein gleichförmig ablaufendes und in seinem Verlauf jederzeit reproduzierbares Verfahren aufklären, wodurch ein bestimmter Restwassergehalt erreicht werden könnte. Es ist aber zwecklos, die physikalischen Bedingungen, die bei einer bestimmten technischen Anlage zur Erreichung eines bestimmten Restwasserendwertes erforderlich sind, schlechthin als optimal für jede andere Gefriertrocknungsanlage angeben zu wollen.

Die Geschwindigkeit, mit der der Trocknungsprozeß abläuft und mit der ein bestimmter Restwassergehalt erreicht wird, ist wechselseitig abhängig von einer ganzen Reihe von Faktoren:

1. Von der Menge Milcheis, dem das Wasser entzogen werden soll, und von dessen Temperatur zu Beginn und während des Verlaufs des Trockenvorgangs.
2. Von dem Vakuumdruck, der über der Eisoberfläche herrscht. Dieser Druck ist abhängig von der Temperatur des Dampfkondensators, von der Pumpenleistung und von dem Dampfdruck über dem Milcheis. Letzterer hängt ab
3. von der Wärmezufuhr außerhalb des Vakuumsystems.

Unter diesen z. T. ständig variierenden Faktoren eine Konstanz der Verhältnisse herzustellen, ist sicher bei einer größeren Anlage unmöglich. Was aber mit Sicherheit im Bereich der technischen Möglichkeiten liegt, ist die Erreichung eines konstanten Endzustandes. Wenn beispielsweise bei unserer Anlage nach Beginn der Nachtrocknungsperiode bei einer Temperatur von 40°C der Enddruck des Vakuums von 10^{-3} Torr erreicht ist, liegt der Restwassergehalt bei 0,5-1%. Ein anderer Hinweis für den aktuellen Feuchtigkeitsgrad während der Nachtrocknung ist der Beobachtung nicht zugänglich. Dieser Endzustand während der Nachtrocknung kann unter verschiedenen Bedingungen nach verschiedenen Zeiten immer erreicht werden. Es kann aber nicht festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt der Nachtrocknung der Restwassergehalt 4-5% beträgt. Während des Gefriertrocknungsprozesses sind Druck- und Temperatur-

schwankungen des Dampfkondensators je nach dem Grad der Belastung der Maschine keine Seltenheit, sondern durchaus die Regel. Alle diese Schwankungen wirken sich letzten Endes immer auf das Dampfdruckgefälle zwischen Eisoberfläche und Dampfkondensator aus, was sich dann in dem zeitlichen Ablauf des ganzen Vorganges bemerkbar macht. Nach dem Gesagten kann die Zeit (Dauer des Trocknungsvorgangs) als Konstante für den Ablauf des Verdampfungsvorgangs zur Erreichung eines optimalen Restfeuchtigkeitsgehaltes nicht anerkannt werden, denn sie ist eine Funktion ständig variierender physikalischer Größen.

Die Einstellung einer größeren Anlage auf einen bestimmten Restwassergehalt scheint also noch ein ungelöstes Problem zu sein.

Im Endzustand besteht ein Gleichgewicht zwischen Adhaesionskraft des Restwassers im Trockengut und Dampfdruck über dem Trockengut. Dieses Gleichgewicht hängt ab von der Leistung der Pumpe und der Temperatur des Dampfkondensators sowie der Wärmezufuhr im Wasserbad. Letztere kann nicht beliebig erhöht werden. Die Temperatur des Kondensators kann nicht beliebig gesenkt werden. Die Pumpenleistung muß ausreichen, das anfänglich starke Dampfangebot absaugen zu können, sonst kann es zu dem Zusammenbruch des Systems (Erhöhung der Eistemperatur diesseits des Tripelpunktes) kommen. Alle drei Faktoren schaffen im Endzustand eine konstante Feuchtigkeit. Die starke Pumpenleistung, die nicht reguliert werden kann, ist einerseits eine Notwendigkeit, andererseits nachteilig, weil sie über den Restwassergehalt von 5% hinausschießt.

Eine kurze Beschreibung der Arbeitsweise unserer Apparatur soll zum Verständnis des angeschnittenen Problems beitragen (08 G, Fa. LEYBOLD-Köln-Bayenthal) (Abb. 1a u. 1b).

1. Das Vorfrieren der Milch.

In einem Kältebad wird eine bestimmte Menge Milch, die in eine Blutkonservenflasche vorgegeben ist, bei luftdichtem Verschuß mittels Gummistopfen, durch Rotieren der Flasche in horizontaler Lage als Eismantel an die Flaschenwand angefroren, und zwar so lange, bis der Eismantel wegen zunehmender Ausdehnung des Eises bei zunehmend tiefen Temperaturen (etwa bei -70°C) wegen Raummangels in der Flasche zu kleinen zusammenhängenden Eisschollen zerbricht. Die Konservenflasche (500 ccm) ist stabil genug, um dem Eisdruck bis zu Mengen von 250 ccm standzuhalten. Die Kältemischung des Kältebades besteht aus 96%igem Äthylalkohol und gepreßtem Kohlensäureschnee

(Trockeneis). Trockeneis hat einen Siedepunkt von -78°C (43). Da der Schmelzpunkt des absoluten Alkohols weit tiefer liegt als der Siedepunkt des Trockeneises, kann der Alkohol bei genügend rascher Zufuhr von Trockeneis allmählich die Temperatur des Trockeneises annehmen. Dem Alkohol wird laufend die Siedewärme (Sublimationswärme), die zur Verdampfung des Trockeneises notwendig ist, entzogen.

2. Das so vorgefrorene Gut wird an die Vakuum-Trockenanlage angeschlossen. Es beginnt die Haupttrocknung. Die Anlage besteht aus einer Vakuumglocke für Flaschenanschlüsse mit Vakuumpumpe und Kühlfalle (Dampfkondensator). Die Kühlfalle erhält ihre Temperatur durch ein zweistufig arbeitendes Kühlaggregat der Fa. LINDE, welches nach folgendem Prinzip arbeitet:

In einem ersten Kühlkreis wird durch einen Kompressor (Hochdruckverdichter) ein Kältemittel Frigen (Difluor-monochlor-methan = CHF_2Cl), welches sich zunächst in gasförmigem Zustand befindet, verflüssigt und über ein Überdruckventil (steuerbar) wieder zur Gasform entspannt. Die Entspannung verbraucht Wärme. Der Wärmeentzug aus dem verflüssigten Frigen in der Entspannungsstrecke wird gesteigert durch gleichzeitige Saugarbeit des Kompressors. Der erzeugte Sog ist proportional der Verdampfungstemperatur und auf einem geeichten Manometer-Thermometer direkt ablesbar. Öffnet man das steuerbare Überdruckventil (Thermoverventil), so ist der Saugdruck auf der "Saugseite" des Aggregates infolge vermehrten Angebots an verdampfendem Frigen höher und die erreichte Temperatur auf der Entspannungsstrecke (Saugseite) proportional ebenfalls höher und umgekehrt. Bei günstiger Einstellung werden im ersten Kühlkreis -35 bis -40°C erreicht.

Die Entspannungsstrecke des ersten Kühlkreises kühlt die Druckseite (Kondensator) eines zweiten Kühlkreises, der in gleicher Weise wie der erste arbeitet, auf ca. -35°C vor. Das Überdruckventil des zweiten Kreises wird automatisch gesteuert durch ein Maximum-Minimum-Druckrelais, welches durch Handgriffe nur beschränkt regulierbar ist. Bei Überschreiten der Grenzdrucke schaltet sich der Kompressor des 2. Kreises ein bzw. aus. Dieser 2. Kompressor ist stärker (Niederdruckverdichter) und kann bei niedrigerer Druckschwelle das flüssige Frigen in die Entspannungsstrecke schneller hineinpumpen und die Erzeugung von Frigendampf in der Entspannungsstrecke durch größere Saugkraft erheblich beschleunigen. Es kommt zu einem stärkeren Energieentzug in der Umgebung der Entspannungsstrecke, wo die Temperatur auf -60 bis -65°C absinkt.

Die Lage der Kühlstrecke (Ort des Verdampfungsvorganges) im Kreis ist abhängig von der Menge Frigen im Kreis. Viel Frigen führt zu einer späten Ver-

dampfung: die Verteilung der Kühlstrecke in der Nähe des Kompressors (Überdruckventils) auf der Saugseite; wenig Frigen führt zu einer frühen Verdampfung: Verteilung in der Nähe des Kompressors ist erkennbar an der Bildung von Reif durch Niederschlag von Eiskristallen aus der atmosphärischen Luft. Die Verteilung der Kühlstrecke muß so reguliert werden, daß die Kühlfalle der Vakuumlöcke im Zentrum der Kühlstrecke liegt (Ort der Wirkung für den von diesen Vorgängen getrennten Gefriertrocknungsprozeß).

Die auf diese Weise tiefgeköhlte Rohrschlange in der Vakuumlöcke dient als Dampfkondensator für den anfallenden Wasserdampf aus dem Gefriertrocknungsvorgang.

Damit das Eis während der Haupttrocknung absublimieren kann, muß ein erheblicher Wasserdampfunterdruck (niederer Dampfpartialdruck) im Vakuum gewährleistet sein. Dieser wird durch die Vakuumpumpe zunächst erreicht, fällt aber mit zunehmendem Dampfdruck bald wieder ab. Bei Betrieb des Dampfkondensators (Kühlfalle) schlägt sich der anfallende Wasserdampf (Eissublimat) an diesem nieder und wird dort fest angefroren. Die Temperatur an der Kühlfalle ist tiefer als an der Milcheisoberfläche und dementsprechend ist der Dampfdruck über dem Eis des Kondensators geringer als über dem Milcheis. Durch die Temperaturdifferenz an den Orten des Eises (Milch-Kühlfalle) kommt es zu einem Dampfdruckgefälle in Richtung Kondensator. Mit zunehmender Schichtdicke des Eises am Kondensator nimmt das Dampfdruckgefälle ab, ein Vorgang, der besonders dann in Erscheinung tritt, wenn die Maschine einer stärkeren Belastung unterworfen ist. Ebenfalls bei stärkerer Belastung kommt es zu einer Labilität der Kühlstreckenverteilung, was unter Umständen zu einem Anstieg des Dampfdruckes über dem Kondensatoreis und damit zu einem Gleichgewicht der Dampfdrucke führen kann, was den Zusammenbruch des ganzen Systems bedeutet. Dieser Umschwung kann durch ständige Überwachung und Regulation am Kühlaggregat vermieden werden. Unvermeidbar ist der Zusammenbruch des Systems, wenn durch zu starke Wärmezufuhr während der Haupttrocknung ein Überangebot an Wasserdampf zustandekommt.

Während der Haupttrocknung nimmt die Oberfläche der Konservenflaschen die gleiche Temperatur an wie das Eis in der Flasche. Die Wärmezufuhr für den Ablauf des Sublimationsvorganges geschieht durch Zutritt der Konvektionswärme der atmosphärischen Luft. Stärkere Wärmezufuhr ergibt eine zu große Dampfbildung. An der Flaschenoberfläche bildet sich infolge Niederschlages der Luftfeuchtigkeit eine dicke Reifschicht. Das Abtauen des Reifeises zeigt den Abschluß der Haupttrocknung an. Der Restwassergehalt beträgt ca. 20%.

3. Nachtrocknung. Es kann nun ohne Überlastung der Anlage die Verdampfungswärme intensiver zugeführt werden. Dies geschieht durch Eintauchen der Konservenflasche in ein Wasserbad von thermostatisch geregelter Temperatur (40° C). Die Flaschen werden so lange im Wasserbad belassen, bis der Vakuumdruck 10^{-3} Torr erreicht hat. Die Betriebsdauer ist je nach Menge der Trockenmilch 3-16-20 Stunden.

Die Nachteile der Gefriertrocknung seien im Zusammenhang genannt:

1. Die Unsicherheit des Entkeimungseffektes nach Durchführung des Trockenverfahrens infolge technischer Schwierigkeiten und damit verbunden, eine Ausbeute der anfallenden Rohmilch von nur 40%.
2. Die geringe Tageskapazität selbst größerer Anlagen, die einer größeren Nachfrage nicht gerecht werden kann.
3. Die hohen Betriebskosten in Verbindung mit einem hohen technischen Aufwand und einem erheblichen Arbeitsaufwand, die zu einer starken Verteuerung des Trockenpulvers führen.
4. Die erforderliche lange Lagerungszeit bei technisch möglicher Einstellung des Verfahrens auf einen optimalen Restwassergehalt von 4-5%, die im Bedarfsfalle eine Blockierung größerer Milchvorräte bedeutet.

Angesichts dieser Schwierigkeiten kann die Ansicht CATELs über die Hitzekonservierung von Frauenmilch in Sammelstellen als "Verkehrung eines sozialen Gedankens in sein Gegenteil" (44) nicht unwidersprochen bleiben. Solange der Sterilisationsschaden nicht allgemein anerkannt ist, wird die Hitzekonservierung ihre Bedeutung auch weiterhin behalten. Die Konservierung von Frauenmilch durch Gefriertrocknung wird daneben ihr Daseinsrecht behaupten können, weil sie die Anlage von großen und dauerhaften Vorräten mit speziellem Verwendungszweck und deren Versand an jeden beliebigen Ort gewährleistet. Nur in dieser Hinsicht scheint dieses Verfahren der Hitzekonservierung wirklich überlegen zu sein.

Mit diesen Erörterungen über die aktuelle Situation dürfte die Bedeutung der Gefriertrocknung als Konservierungsverfahren für Frauenmilch hinlänglich geklärt sein: Trocknung und Lagerung, auf sich allein gestellt, entsprechen noch nicht den praktischen Bedürfnissen eines Konservierungsverfahrens, das eine breite Anwendung finden soll.

B) PROBLEMDARSTELLUNG

Untersuchungen jüngerer Datums über das Verhalten von Eiweißkörpern und Enzymen in getrocknetem biologischem Material gegenüber hohen Temperaturen gaben den Anstoß zur Teilbearbeitung eines Problems, welches die vorliegende Arbeit zum Gegenstand hat:

Können in gefriergetrockneter Frauenmilch durch Anwendung hoher Temperaturen die darin enthaltenen Keime vernichtet werden ohne Zerstörung der nativen Eigenschaften der Milch? - Ist diese Verfahrensweise als ein mögliches Zusatzverfahren zur Konservierung von Frauenmilch durch Gefriertrocknung anwendbar?

Aus diesem Fragenkomplex wird der Einfluß hoher Temperaturen auf die Proteine gefriergetrockneter Frauenmilch isoliert bearbeitet.

Die erwähnten Untersuchungen (NEUMANN (45)) beweisen eine hohe Temperaturresistenz von Eiweißkörpern und Enzymen in biologischem Material nach Gefriertrocknung. Während der Haupttrocknung nimmt das gefriergetrocknete Gut grundsätzlich andere Eigenschaften an als das Nativpräparat und dessen Zustandsänderungen - Sol- und Gelzustand - während der Haupttrocknung und als das wiederaufgelöste Trockengut. Für diese besteht gegenüber höheren Temperaturen die gleiche Empfindlichkeit. Die Thermostabilität steigt zunehmend mit Beginn der Nachtrocknung und erreicht eine beachtliche Zuverlässigkeit bei einem Restwassergehalt von 6-4% und weniger. Die einwirkende Temperatur darf um so höher sein, je niedriger der Restwassergehalt des Präparates ist. Danach bleiben die Eiweißkörper nach einstündiger Einwirkung von über 100° C fast unbeeinflusst. Ähnlich stabil sollen sich aber auch gefriergetrocknete Bakterienkulturen gegenüber hohen Temperaturen verhalten. Die Hitzebelastung wurde bei Temperaturen von 80-120° C für die Dauer von einer Stunde durchgeführt. Das Ergebnis ist eine hohe Temperaturresistenz sowohl der Proteine als auch der lebenden Bakterien im Trockengut.

Dieses Ergebnis ist zunächst wenig ermutigend im positiven Sinne des aufgeworfenen Problems. Aber sollte sich die verschiedene Beeinträchtigung der Keime einerseits und der übrigen organischen Bestandteile in der Milch andererseits durch die Gefriertrocknung und anschließende Lagerung, die SAGER (46) in allgemeiner Formulierung als Ausdruck parallel verlaufender Beeinflussun-

gen verschiedener biologischer Substrate auffaßt, bei der Anwendung einer Hitzebelastung auf das Trockengut nicht wiederholen? Ist es möglich, daß sich dieser Eingriff in noch stärkerem Maße unterschiedlich an der lebenden Bakterienzelle und den übrigen organischen Substanzen der Milch auswirkt als dies - wie SAGER zeigen konnte - durch den Eingriff der Gefriertrocknung mit anschließender Lagerung bereits geschieht? - Diese Fragen zwingen zu einer Reihe theoretischer Überlegungen:

1. Über das Verhalten der Mikroorganismen beim trockenen Erhitzen. Mikroorganismen sind in ihrer Lebensfähigkeit wie jede lebende Zelle von der Erhaltung ihrer Baustruktur und von dem reibungslosen Funktionieren ihres Stoffwechsels abhängig. Ein funktionstüchtiger Zellstoffwechsel setzt aber intakte, z. T. strukturgebundene Fermentsysteme voraus. Am Beispiel der Sulfonamide läßt sich überzeugend erkennen, daß die Blockierung eines Einzelfermentes durch eine "falsche" Para-amino-benzoesäure (Sulfonamid) den Stillstand des gesamten Stoffwechsels bedeutet. Die klaffende Lücke, die angesichts der Vielzahl von möglichen Reaktionen durch Umgehung einer lebenswichtigen Reaktion ersatzweise geschlossen werden können, kann aber nicht überbrückt werden. Der Mikroorganismus geht zugrunde. Die Chance der Hitzeanwendung sollte in der Möglichkeit liegen, die Fermente des Mikroorganismus thermisch "cracken" zu können und dadurch den Zellstoffwechsel gleichzeitig an mehreren Stellen zu blockieren. Dabei darf es aber nicht zu der Zerstörung oder Veränderung von Molekülen kommen wie im Beispiel der Sulfonamide, denn dann wären alle anderen organischen Substanzen (Moleküle) in gleicher Weise der Veränderung ausgesetzt, und damit wäre die ganze Fragestellung unsinnig. Die Blockierung des Stoffwechsels muß durch "Zerstörungsvorgänge" gewissermaßen auf einer höheren Ebene durch Aufspaltung von Systemen und nicht durch Veränderung der Bauelemente erfolgen. Eine chaotische Stoffwechsellaage, eine völlige Diskoordination der Funktionselemente (Fermente und Zellstrukturen) sollte die Bedingungen schaffen können, unter denen ein Mikroorganismus materiell und energetisch insuffizient werden und zugrunde gehen muß. Wenn die in der Milch vorkommenden Fermente eine thermische Belastung, die eine Vernichtung von Mikroorganismen bedeutet, überstehen, d. h. wenn sie nach der Erhitzung noch funktionstüchtig gefunden werden, so darf ein solcher Mechanismus angenommen werden. Bekanntlich sind Lipide und Lipoproteine z. T. am Aufbau von Strukturen der Zelle beteiligt. Wie spätere Untersuchungen zeigen werden, sind diese Substanzen von 37° C an aufwärts schmelzbar, ohne daß die Lipidmoleküle zerstört zu sein brauchen. Es handelt sich also lediglich um eine

Änderung der physikalischen Zustandsform. Bei hohen Temperaturen ist mit einem solchen Vorgang auch bei den Lipoiden der "Bakterienzelle" zu rechnen, was zu einer Strukturzerstörung innerhalb der Zelle führen muß und damit zu gestörter Funktion. Hierin dürfte eine Erklärung für die Vorgänge bei der Keimvernichtung durch Anwendung hoher Temperaturen liegen.

2. Über das Verhalten der in der Milch vorhandenen organischen Substanzen beim Wasserentzug durch Gefrieretrocknung und bei Erhitzung.

a) Infolge elektrischer Eigenschaften und Kräfte (Van der WAALS) sind alle wasserlöslichen chemischen Verbindungen gezwungen, in wässriger Lösung Wassermoleküle adsorptiv zu binden. Darin liegt die Funktion des Wassers als Lösungsmittel begründet. Engt man in einer wässrigen Lösung den Wassergehalt bis zu einem bestimmten Grade ein, so können sich die gelösten Moleküle zusammen mit dem adsorptiv gebundenen Wasser je nach Bauart und räumlicher Struktur in einem bestimmten Verband ordnen und auskristallisieren. Ein aus wässriger Lösung gewonnener Kristall entsteht immer unter Mitverwendung adsorptiv gebundenen Wassers. Bei noch schärferem Wasserentzug können sich die Moleküle unter Umständen mit anderem Wassergehalt neu ordnen. Geht man mit dem Wasserentzug noch weiter, so wird ein Zustand erreicht, in dem nur noch chemisch gebundenes Wasser unter Bildung eines Kondensationsproduktes abgespalten werden kann. Aus einer einzelnen Verbindung kann ein Anhydrid, aus mehreren Verbindungen kann ein beliebiges Kondensationsprodukt entstehen. Solche Verbindungen wären z. T. bei Wasserzutritt wieder in Hydratform, d. h. in ihre Ausgangsform rückformbar. Dies wäre ein teilweise reversibler Vorgang. Ein weiterer Schritt im Wasserentzug organischer Substanzen führt zur Zerstörung der ursprünglich gelösten Moleküle selber (beispielsweise Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure auf Zucker oder Zellulose). Stufenweiser Wasserentzug erfordert in steigendem Maße Energie, und zwar für Kondensationsvorgänge mehr als für die bloße Abspaltung adsorptiv gebundenen Wassers. Bei noch größerem Energieaufwand wird die kinetische Energie der einzelnen Atome groß genug, um sie aus ihrem Molekülverband lösen zu können. Dieser Prozeß der Molekülzerstörung bedeutet für organische Verbindungen bei Abwesenheit von Sauerstoff ihre Verkohlung und bei Sauerstoffzutritt ihre Verbrennung. Die Energiezufuhr beim Erhitzen des Trockengutes darf das Abdampfen adsorptiv gebundenen Wassers nicht überschreiten. Irreversible Anhydridbindungen und Molekülzerstörungen müssen unter allen Umständen vermieden werden. In beiden Fällen wären die biologischen Substanzen (Eiweißkörper, Kohlehydrate und Fette) so verändert, daß sie andere physikalische und chemische Eigenschaften annähmen.

b) Das Verfahren der Gefriertrocknung gewährleistet einen Wasserentzug bis zur Stufe des adsorptiv gebundenen Wassers, bis unterhalb der für die Erhitzung kritischen Restwasserwerte von 6-4%. Das noch verbliebene Wasser ist "fest" an die ursprünglich in der Milch gelösten Substanzen gebunden, und es ist unwahrscheinlich, daß ein solcher Restwassergehalt noch als Lösungsmittel für irgendwelche chemischen Umsetzungen fungieren kann, wenn man das gewonnene Trockengut physikalischen Bedingungen unterwirft, die bei nicht getrocknetem Material innermolekulare und intermolekulare chemische Reaktionen hervorrufen würden (Erwärmung, Erhitzung etwa auf 100 Grad C). Solche Vorgänge treten ein beim Abkochen der Milch. Hohe Temperaturen führen in Anwesenheit von Wasser zu neuartigen chemischen Verbindungen: z. B. Denaturierung durch Lösung von Wasserstoffbrücken zwischen Peptidketten von Eiweißmolekülen, hydrolytische Spaltung von Peptidketten, Lösung von Sulfidbindungen, Bildung von Sulfhydrylgruppen (Lysinverlust), Maillard-Reaktion (unlösliche Verbindung zwischen Eiweißmolekülen und Zuckermolekülen über die NH_2 -Gruppen der Aminosäuren) Aminosäurenverlust (47). Danach setzt die Erhitzung organischen Trockengutes einen extrem niedrigen Restfeuchtigkeitsgehalt voraus, damit solche Reaktionen nicht stattfinden können.

In diesen theoretischen Überlegungen werden die Grenzen deutlich, innerhalb derer sich die Erhitzung gefriergetrockneter Milch bewegen darf.

1. Ein Mindestmaß an Restfeuchtigkeit muß gegeben sein, wenn innermolekulare und intermolekulare Reaktionen nicht stattfinden sollen.
2. Die Energiezufuhr beim Erhitzen des Trockenmaterials darf nicht so groß sein, daß es zu organischen Molekülveränderungen kommt, sie muß aber groß genug sein, um in der Milch vorhandene Keime zu zerstören.

Im folgenden soll experimentell geklärt werden, ob es einen solchen Grenzbe-
reich gibt, d. h. ob durch Erhitzen von Trockenmilch die Bakterien in erheblichem Maße geschädigt und vernichtet werden können ohne wesentliche Veränderung der Milcheiweißkörper.

Die zur Klärung des Problems gewählten Untersuchungsmethoden sind:

1. die grobe Beobachtung,
2. elektrophoretische Untersuchungen,
3. vergleichende Fermentuntersuchungen,
4. bakteriologische Tests.

C) EXPERIMENTELLER TEIL

Grobe Beobachtung

Orientierende Versuche

Die ersten Versuche wurden mit älteren Trockenmilchproben von je 200 g Milch aus routinemäßig hergestellter Trockenmilch vorgenommen (Restwassergehalt zwischen 1 und 3%).

Bestimmung der Restfeuchtigkeit:

Einwaage einer beliebigen Menge Trockenpulver in einem Wägeschälchen. Einbringen des Wägeschälchens für 20 min in den Trockenschrank bei 100° C. Vom Trockenschrank gelangt die Probe in einen Exsikkator mit frischem Phosphorpentoxyd für 30 min. Danach wird die Probe erneut gewogen. Die Berechnung erfolgt nach der Formel

$$\text{Feuchtigkeitsgehalt in \%} = 100 - \frac{\text{Trockengewicht}}{\text{Ausgangsgewicht}} \times 100$$

bezogen auf das Ausgangsgewicht des Trockenmilchpulvers. Dieses Verfahren erhebt nicht den Anspruch großer Genauigkeit, jedoch ist diese zur Orientierung genügend exakt.

Es werden kleine Proben in hitzestabile Schälchen gegeben und bei verschiedenen Temperaturen über verschiedene Zeiten einer Belastung ausgesetzt. Als Kriterien für auftretende Veränderungen werden folgende Erscheinungen gewertet:

gelbliche Verfärbung:	+
braune Verkohlung:	++
schwarze Verkohlung:	+++
Löslichkeit des belasteten Materials:	
sehr gut: ++, gut: +, unlöslich:	Ø

Die Ergebnisse sind in Tabellenform wiedergegeben:

Trockenmilch	Temp. Grad C	Zeit	Veränderungen	Geruch
A I	100	1 h	Ø	normal
	120	1 h	++	Brandgeruch
	150	1 h	+++	Brandgeruch
	120	10'	Ø	beißender Geruch
	120	20'	++	Brandgeruch
	120	30'	+++	Brandgeruch
	120	15'	++	Brandgeruch
	150	15'	+++	Brandgeruch
	150	5'	++	Brandgeruch

Der Restfeuchtigkeitsgehalt beträgt 1-3%.

Durch Erhitzen belastetes, unverändert gebliebenes Trockenpulver läßt sich besser wiederauflösen als unbelastetes Material. Verkrustetes und angekohltes Pulver ist unlöslich.

Trockenmilch	Temperatur	Zeit	Veränderungen	Löslichkeit
B	100	1 h	++	Ø
	100	30'	+	(+)
	100	15'	Ø	+
C I	100	1 h	Ø	++
	100	2 h	Ø	++
	100	3 h	Ø	++
	100	4 h	Ø	++
	100	5 h	Ø	+
	100	6 h	(+)	(+)
	120	1 h	++	Ø
	120	30'	++	Ø
	120	15'	++	Ø
	120	10'	+	(+)
	120	5'	Ø	+
	110	1 h	++	Ø
	110	30'	++	Ø
	110	15'	+	(+)
	110	10'	+	(+)
	110	5'	Ø	+

Trockenmilch	Temperatur	Zeit	Veränderungen	Löslichkeit
C IV	105	1 h	+	(+)
	105	45'	Ø	+
D I	100	1 h	Ø	++
	100	5 h	Ø	+
	100	6 h	+	(+)
	100	5h30'	Ø	+
	105	1 h	Ø	(+)
	105	45'	+	(+)
	105	30'	Ø	+
	120	30'	++	Ø
II	120	15'	++	Ø
	120	10'	+(+)	Ø
	120	10'	++	Ø
E I	105	1 h	+	(+)
	105	45'	+	(+)
	105	30'	Ø	+
	100	1 h	Ø	++
	100	6 h	Ø	+
	100	6 h	Ø	+
F	100	1 h	++	Ø
G	100	1 h	Ø	++
	100	6 h	+	(+)

Angebräuntes Trockengut zeigt große Ähnlichkeit mit den Erscheinungen beim Backvorgang (Brötchen) oder mit einem Röstprozeß: braune Kruste außen und gelblicher Kern innen. In diesem Fall und auch bei der schwarzen Verkohlung fließt das Material zu einer klebrigen Masse zusammen und nimmt dann eine feste Form an.

Zwischen Veränderungen und der Löslichkeit korrespondieren:

- 1.) unverändertes Material - gute bis sehr gute Löslichkeit,
- 2.) gelbliches Material - schlechte Löslichkeit,
- 3.) angekohltes Material - keine Löslichkeit.

Diese Versuche haben eine wesentliche Beobachtung zum Ergebnis: Die Uneinheitlichkeit im Verhalten der verschiedenen Milchproben gegenüber gleichen Bedingungen. Bei Restfeuchtigkeitswerten von 1-3% sind höhere Temperaturen als 100° C nicht geeignet zum Erhitzen von Trockenmilch. Aber selbst

bei 100° C kann es zu Rösterscheinungen kommen. Entsprechend unzuverlässig erweist sich der Faktor Zeit für die Erkennung einer zulässigen Hitzebelastung. Bei 100° C sind einzelne Proben bereits vor Ablauf einer Stunde verändert. Andere Proben überstehen die gleiche Temperatur über mehrere Stunden ohne merkliche Veränderungen. Diese Erfahrung widerspricht teilweise den Ergebnissen, die NEUMANN berichtet, wenn er für die Temperaturresistenz so empfindlicher Substanzen wie Fermente bei einem Grenzwert von 6-4% Restwassergehalt nach einer Stunde Hitzebelastung eine kaum verminderte Aktivität angibt.

Für diese Unterschiedlichkeit des Trockengutes gegenüber gleichen physikalischen Bedingungen könnten zwei verschiedene Gegebenheiten verantwortlich sein: 1. Eine verschiedene Zusammensetzung der einzelnen Milchproben, 2. ein unterschiedlicher Restfeuchtigkeitsgehalt. Einen brauchbaren Hinweis bietet ein Modellversuch mit Filtrierpapier Nr. 597, SCHLEICHER & SCHÜLL, welches in trockenem Zustand keine Veränderung, in handtrockenem eine leichte Bräunung und in feuchtem Zustand eine Verkohlung oder eine Röstung erfährt. Dementsprechend scheint dem Restfeuchtigkeitsgehalt die größere Bedeutung für den Grad der Veränderung in Abhängigkeit von der Zeit zuzukommen. Der Restfeuchtigkeitsgehalt muß, um grob erkennbare Veränderungen zu vermeiden, unter einem Prozent liegen. Diesen Untersuchungen zufolge wäre eine Prüfung der genauen Beziehungen zwischen Feuchtigkeitsgehalt und Hitzeschädigung notwendig. Der kritische Grenzwert liegt nach diesen ersten Erfahrungen bei einem Prozent Restwassergehalt. Da aber eine exakte Feuchtigkeitsbestimmung unter einem Prozent nur mittels komplizierter Apparaturen unter Vakuum titrimetrisch zu ermitteln ist (Verfahren nach FISCHER) und solche Möglichkeiten aber nicht gegeben sind, wird auf eine exakte Aufklärung der Verhältnisse verzichtet und eine Kompromißlösung des Problems angestrebt: Kleinere Milchmengen sollen bei schonenden Temperaturen extrem lang nachgetrocknet werden. Die Proben der ersten Versuche waren der laufenden Trockenmilchproduktion unserer Sammelstelle entnommen. Bei ihrer Herstellung mußte die Trockenanlage jeweils unter maximaler Belastung arbeiten, so daß extrem niedrige Restfeuchtigkeitswerte nicht gegeben waren und mit einer geringeren Schwankungsbreite des Wassergehaltes zu rechnen war. In den folgenden Versuchen gelangen jeweils 20 ccm Milch in die Trockenanlage. Die Nachtrocknung erfolgt 6 Stunden lang bei 50° C nach vorausgehender Entfernung des Eisbelages am Wasserdampfkondensator (ca. -60° C, 10^{-3} Torr). Genauere Angaben über den Erfolg dieses Verfahrens bezüglich des Restfeuchtigkeitsgehaltes können also nicht gemacht werden. Zumindest lassen sich aber jetzt die Verfahrensbedingungen, die als

Voraussetzung für eine Hitzebelastung wesentlich sind, einheitlich angeben. Stichproben ergaben einen Restwassergehalt von unter 1%.

Ergebnisse

Trockenmilch	Temperatur	Zeit	Veränderungen	Löslichkeit	
A	I	100	1 h	Ø	++
		100	5 h	Ø	++
	II	120	1 h	++	Ø
		120	30'	+ (+)	Ø
		120	15'	Ø	(+)
	III	105	1 h	++	Ø
		105	45'	+	(+)
		105	30'	Ø	++
B	I	100	1 h	Ø	++
		100	5 h	Ø	+ (+)
	II	105	1 h	+	Ø
		105	45'	Ø	+
		105	30'	Ø	++
C	I	100	5 h	Ø	++
	II	105	1 h	++	Ø
		105	45'	+	(+)
		105	30'	Ø	++
D	I	100	5 h	+	(+)
	II	105	1 h	++	Ø
		105	45'	+ (+)	Ø
		105	30'	+	(+)
		105	15'	Ø	++

Die Ergebnisse zeigen jetzt eine weit bessere Übereinstimmung als die der vorhergehenden Versuchsreihe. Schwankungen sind praktisch nur noch bei Anwendung von Temperaturen über 100° C zu verzeichnen. Das Verhalten der Trockenproben bei 100° C in Abhängigkeit von der Zeit ist gleichmäßig und übereinstimmend. Mit diesen Untersuchungen sind bezüglich der anwendbaren Temperatur und der Dauer der Hitzebelastung entsprechend den theoretischen Überlegungen ein Grenzbereich abgesteckt, innerhalb dessen sich grob erkennbare Veränderungen infolge Erhitzens vermeiden lassen: Bei der Leistungsfähigkeit der zur Verfügung stehenden Trockenanlage liegt die zulässige Höchst-

temperatur bei 100°C ; als zeitliche Höchstgrenze bei dieser Temperatur dürfen 5 Stunden angegeben werden. Möglicherweise lassen sich auch Hitzebelastungen von gefriergetrocknetem Material bei höheren Temperaturen (120°C) ohne Schädigung erzielen. Da eine eindeutige Abhängigkeit der Schädigung vom Restwassergehalt erwiesen ist, hat eine solche Möglichkeit einen extrem niedrigen Restfeuchtigkeitsgrad zur Voraussetzung.

Scheinbar paßt das Auftreten von Rösterscheinungen nicht ganz in den Rahmen der theoretischen Überlegungen von Seite 17, Punkt 2. Bei näherer Betrachtung der möglichen Vorgänge ergibt sich auch für diese Erscheinung eine Erklärung:

Infolge des starken Wasserentzuges während der Nachtrocknung ist zur weiteren Austreibung von Restwasser beim Erhitzen eine stärkere Energie notwendig, um die stärkere Bindung des verbliebenen Restwassers durch Van der WAAL'sche Kräfte lösen zu können. Die Anwendung einer höheren Temperatur verleiht den Wassermolekülen eine höhere kinetische Energie, die die Bindung an die Trockensubstanzen überwinden kann. Die freigewordenen Wassermoleküle liegen dann im Trockengut in Form überhitzten Wasserdampfs vor. Sicherlich gibt es einen Übergangsbereich vom Gelzustand während der Haupttrocknung bis zum Zustand extremer Trockenheit nach Abschluß der Nachtrocknung, in dem der Dampfgehalt beim Erhitzen noch intensivere chemische Umsetzungen erlaubt, als sie bei einfachem Kochprozeß zu beobachten sind, und in dem Vorgänge möglich sind, die mit einer Molekülzerstörung durch Atomabsplaltung bei starker Trockenheit nicht vergleichbar sind. Auch diese Möglichkeit der Entstehung einer ausreichenden Menge überhitzten Wasserdampfes muß also vor der Hitzebelastung durch intensive Nachtrocknung ausgeschaltet werden.

Als weitere Kriterien für grobe Veränderungen durch Hitzebelastung seien zwei zusammenhängende Eigenschaften der Frauenmilch genannt: 1. das Aufrahmungsvermögen und 2. die Möglichkeit zur Erzeugung von Frauenmilchbutter.

1. Erhitzte Trockenmilch, die die Hitzebelastung ohne erkennbare Veränderungen übersteht, kann nach Wiederauflösung ohne Unterschied im Verhalten gegenüber Nativmilch durch Zentrifugieren entrahmt werden.

2. Aus Frauenmilch läßt sich durch Schütteln bei 15°C in einem Arbeitsgang Butter erzeugen ohne die Notwendigkeit voraufgehender Entrahmung. Gefriergetrocknete und erhitzte Trockenmilch, die ohne erkennbare Veränderung aus der Hitzebelastung hervorgeht, zeigen in dieser Fähigkeit kein

unterschiedliches Verhalten gegenüber der Nativmilch; allerdings muß die aus Gründen einer besseren Löslichkeit auf 37° C erwärmte Milch vor dem Buttern erkalten. Die Körperwärme läßt ein Buttern mißlingen. Demgegenüber gehen die genannten Fähigkeiten für abgekochte und wieder erkaltete Milch und für hitzgeschädigtes Trockenmaterial verloren.

Die voraufgehenden Untersuchungen zum Ausschluß grober Veränderungen schließen aber feinere Veränderungen an den Proteinen der Milch noch nicht aus. Sie dienen lediglich dazu, den Grenzbereich und die Arbeitsbedingungen zu bestimmen, innerhalb derer mit einschneidenden Veränderungen in der Feinstruktur der Proteine nicht mehr zu rechnen ist.

II. Papierelektrophoretische Untersuchungen

Methodik

Den folgenden Untersuchungen liegt das Verfahren von GRASSMANN und HANNIG (48) zugrunde.

Das Verfahren im Überblick:*

1. Vorbereitung der Milchproben.
2. Die Pufferlösungen und ihre Herstellung.
3. Auftragen der Proben und Einsetzen der Streifen in die Kammern.
4. Laufzeit unter Gleichstrom.
5. Entnahme, Lufttrocknung, Nachtrocknung bei 100° C.
6. Färbung mit Amido-Schwarz und Entfärben.
7. Erzeugung einer Transparenz der Streifen.
8. Automatische Auswertung mit dem Extinktionsschreiber der Fa. Carl ZEISS.
9. Die Zerlegung der Gradientenkurven.
10. Die Planimetrie mit dem OTT'schen Planimeter.
11. Die Einzelfractionen im Verhältnis zur Gesamtfläche.

Untersuchungen mit "gereinigter" Magermilch

1. Einzelproben zu 20 ccm einer Frauenmilch werden in ERLNMEYER-Kolben pipettiert und gelangen zur Gefriertrocknung. Mit Ausnahme einer Probe wird die Trockenmilch verschiedenen starken Hitzebelastungen bei 100° C im Trockenschrank ausgesetzt. Nativmilch, gefriergetrocknete und trockenerhitzte Milch der gleichen Ausgangsmilch bilden zusammen

jeweils eine Charge. Die getrocknete und trockenerhitzte Milch werden mit Aqua dest. bei 37° C aufgelöst und im 20-ccm-Meßkolben auf das Ausgangsvolumen gebracht nach vorherigem Abkühlen auf Zimmertemperatur. Die Proben werden so lange geschüttelt, bis sich das Fett zu griesiger Butter zusammenballt. Danach wird durch Zellstoff grob filtriert, das Filtrat bei 3000 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert. Die noch übrig bleibende dünne überstehende Fettschicht wird durch Absaugen an der Wasserstrahlpumpe verworfen. Filtration der so gewonnenen Magermilch durch Filtrierpapier Nr. 597 der Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL. Das Filtrat ist undurchsichtig opaleszent. Diese gereinigte Magermilch gelangt zur elektro-phoretischen Untersuchung.

2. In dieser ersten Versuchsreihe wird Dole-Puffer verwandt mit folgender Zusammensetzung: Veronal-Natrium 0,1 molar, Veronal 0,02 molar.

Die Berechnung ergibt sich aus dem jeweiligen Molargewicht in Gramm, multipliziert mit der angegebenen Molarität für 1 Liter. Molekulargewicht für Veronal = 184,192 multipliziert mit 0,02 ergibt die Menge von 3,68 Gramm in 1 Liter Lösung.

Molekulargewicht von Veronal-Natrium = 206,181 multipliziert mit 0,1 ergibt die Menge von 20,6 Gramm in 1 Liter Lösung.

Die errechneten Substanzmengen werden eingewogen und zusammen in einem 1000-ml-Meßkolben warm aufgelöst; die Auffüllung mit Aqua dest. bis zur Meßmarke erfolgt nach Abkühlung der Lösung auf Zimmertemperatur.

Prüfung der Wasserstoffionenkonzentration:

MERCK-Universalindikator: pH 8,9

Lyphan L674: pH 8,5

pH-Meter (Fa. L. PUSL, München): pH 8,6

Wägefehler werden durch Säure- oder Basentitration unter fortlaufender Messung am pH-Meter ausgeglichen. Die Pufferlösung ist bei pH 8,6 eingestellt und verwendungsfähig.

3. Filtrierpapierstreifen Nr. 2043 a Mgl der Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL werden in Pufferlösung getränkt und auf die Holmen des Elphorgerätes gespannt. Abtupfen der mit Bleistift markierten Auftragsstelle. Auftragung von 0,1 ml Milchprobe mittels Blutzuckerpipette. Unmittelbar danach gelangen die Streifen in die unter elektrischer Spannung stehenden Kammern.
4. Die angelegte Feldspannung, gemessen in der Kammerflüssigkeit, be-

trägt 90 Volt. Luftdichter Verschuß der Kammer, Laufzeit 12 Std. Kontrollen der Feldspannung in 4-stündigen Abständen. Durch Abscheiden von Veronal-Kristallen an der Anode kommt es zu merklichem Spannungsabfall. Reinigung der Anode mechanisch ohne Unterbrechung der Stromspannung. Dadurch läßt sich die ursprünglich angelegte Spannung meist wieder herstellen. Notwendige Korrekturen werden durch Erhöhen der Ausgangsspannung vorgenommen.

5. Entnahme der Streifen samt Holmen. Trocknung an der Luft. Nachtrocknung mittels Heißluftföhn. Trockenes Erhitzen der vorgetrockneten Streifen bei 100° C im Trockenschrank 30 Minuten lang.

6. Färbung der Streifen mit Amido-Schwarz-10 b "BAYER".

Zusammensetzung der Farbstofflösung:

Amido-Schwarz	50,0
Acid. acetic. glacialis	50,0
Methanol	450,0

Die Lösung bleibt mehrere Tage unter Verschuß, es entsteht eine gesättigte Amido-Schwarz-Lösung.

Die getrockneten Streifen werden unter leichtem Schwenken 10 Minuten lang in einer Färbeschale mit Farbstofflösung getränkt. Anschließend Entfärben.

Entfärberlösung: 100 ml Eisessig gemischt mit 900 ml Methanol (vgl. Farbstoffträger der Amido-Schwarz-Lösung).

Es wird fraktioniert entfärbt. Dadurch kommt es zu einem stufenweisen Entzug des Farbstoffes durch sukzessives Zugabe und Verwerfen des Entfärbers nach ausreichender Absättigung mit Farbstoff. Dauer des Entfärbungsvorganges 6 Std. Ausdrücken der Streifen zwischen sauberen Filterpapierfolien. Trocknen an der Luft oder im Abzug.

7. Erzeugung der Transparenz durch Einlegen der Streifen in Transparenzöl (Paraffinöl und Bromnaphthalin) für 24 Std.
8. Automatische Auswertung mit dem Extinktionsschreiber der Fa. Carl ZEISS.
9. Die Zerlegung der automatisch gewonnenen Gradientenkurven. Eigenes Verfahren (Abb. 2a u. b).

Zu Abb. 2a: Die Lage der Hauptmaxima im Verlauf der Extinktionskurve kann einigermaßen genau bestimmt werden. Meistens findet sich im Verlauf der Kurve nur eine Front, die ohne nennenswerten Fehler bis zur Basis durchgezeichnet werden kann. Zu dieser Front wird durch das zugehörige Maximum eine Achse senkrecht zur Basis gezeichnet und die Front

symmetrisch hinter die Achse verlegt. Es entsteht auf diese Weise eine annähernd richtige MAXWELL'sche Verteilungskurve. Damit ist eine Fraktion deutlich aus der von der Extinktionskurve umfaßten Fläche herausgearbeitet. Ein nächster Schritt ist das Abgreifen des über der ersten MAXWELL-Kurve überstehenden Flächenrestes in Millimeterabständen und Transferieren auf die Basis. Dadurch gelingt es, die zuerst gefundene Fraktion aus der Betrachtung der Restfläche auszuschließen. Es entsteht die Extinktionskurve der Restfläche, deren vordere und hintere Front, die der zuerst gefundenen Fraktion benachbart sind, bereits auf der Basis aufsitzen. Jede Abweichung der Extinktionskurve (Richtungsänderung) nach der Horizontalen zeigt die Lage eines neuen Maximums an. An solchen Stellen wird wieder eine senkrechte Achse zur Basis gezeichnet. Der Kurvenanteil vor der Achse wird wiederum symmetrisch hinter die Achse übertragen. Die Restfläche über dem so gefundenen Schenkel der MAXWELL'schen Kurve wird wieder auf die Basis aufgesetzt usw., bis die Gesamtfläche in ihre Bestandteile zerlegt ist. Zu Abb. 2b: Reichen mehrere Vorder- und Hinterfronten bis in die Nähe der Basis, so können sie frei durchgezeichnet werden. Die weitere Zergliederung in beiden Richtungen zur Erschließung der Restflächen geht wie bei Abb. 2a vor sich.

10. Planimetrie der Flächen unter den MAXWELL'schen Verteilungskurven und unter der Extinktionskurve insgesamt in doppelter Messung. Im OTT'schen Planimeter entspricht eine Flächeneinheit (FE) $0,5 \text{ cm}^2$.
11. Die Einzelfraktionen im Verhältnis zur Gesamtfläche.
Die Einzelfraktionen werden ausgemessen und addiert. Die Summe der Einzelfraktionen sind 100% der Gesamtfläche. Der Anteil der Einzelfraktion an der Gesamtfläche ergibt die Relativprozente.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe I sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Probenbezeichnung: Chargen in fortlaufenden römischen Ziffern, Chargenanteile: N = Nativmilch, T = gefriergetrocknete Milch, K = gekochte Milch. Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer der Belastung (Kochen oder trockenes Erhitzen).

K	5'	16,4 (16,5)	-	-	3,0	4,3	-	28,0	8,5	56,1	(36,5)	(92,6)
T	1 h 30'	17,1 (16,8)	-	2,9	(2,3)	20,5	-	28,7	14,0	31,6	42,7	74,3
	2 h 0'	20,1 (19,7)	-	3,0	(3,0)	23,4	-	34,3	8,0	28,4	42,3	70,7
	3 h 0'	16,6 (16,5)	-	1,8	(3,0)	28,9	-	33,7	11,4	21,1	45,1	66,2
VIII	T 1 h 30'	15,9 (16,4)	-	1,9	2,5	27,7	-	33,3	10,1	24,5	43,4	67,9
	2 h 0'	18,4 (18,4)	-	2,2	1,1	27,2	-	35,3	10,3	23,9	45,6	69,5
	3 h 0'	22,5 (22,6)	-	4,0	1,8	31,1	-	31,6	12,0	19,6	43,6	63,2
	4 h 0'	14,5 (14,6)	-	4,1	3,4	40,7	-	27,6	13,9	10,3	41,5	51,8
IX	2 h 0'	13,1 (13,1)	-	2,3	1,5	27,5	-	43,5	8,4	16,8	51,9	68,7
	4 h 0'	18,9 (19,0)	-	4,2	1,6	23,8	-	33,9	16,9	19,6	50,8	70,4
X	T 1 h 30'	18,5 (18,3)	-	4,3	2,2	34,6	-	30,3	11,4	17,3	41,7	59,0
	2 h 0'	16,3 (16,1)	-	3,7	1,2	31,3	-	33,1	13,5	17,2	46,6	63,8
	3 h 0'	22,8 (23,3)	-	3,1	1,3	28,9	-	37,7	14,5	14,5	52,2	66,7
	4 h 0'	15,9 (15,9)	-	3,8	1,9	28,3	-	38,4	14,5	13,2	52,9	66,1
XI	T -	16,4 (16,7)	-	3,0	1,8	26,2	-	40,9	10,4	17,7	51,3	69,0
	2 h 0'	23,6 (23,5)	-	4,2	2,1	37,3	-	35,2	14,4	6,8	49,6	56,4
	3 h 0'	13,1 (12,6)	-	2,3	2,3	32,8	-	37,4	14,5	10,7	51,9	62,6
XII	T 2 h 0'	18,2 (18,2)	-	3,8	1,6	28,6	3,8	48,9	8,2	4,9	57,1	62,0
	3 h 0'	16,5 (16,2)	-	1,8	1,2	28,5	-	43,6	13,2	12,1	56,6	68,7

II. Untersuchungen mit "Milchserum eigener Herstellung"

1. Herstellung des Milchserums in 2,5-facher Verdünnung, s. unter Kapitel "Aufbau der Phosphatasereaktion".
2. Als Puffer dient der zur Herstellung von Serumanalysen geeignete Veronal-Natriumacetat-Puffer nach MICHAELIS (49).
3. Aufgetragene Serummenge: 0,04 ml Milchserum.
4. Auf den Streifen wirkende Spannung: 90 Volt. Alle übrigen Bedingungen stimmen mit denen der Versuchsreihe I überein.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe II sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Probenbezeichnung: Chargen in fortlaufenden Buchstaben des ABC.

Chargenanteile: N = Nativmilch, T = gefriergetrocknete Milch, T3 = 3-Stunden lang bei 100° trockenerhitzte Milch, K = "gekochtes" Milchserum.

Kochversuche:

Aus Nativmilch gewonnenes Milchserum wird in 4 Proben von je 5 ml in Reagenzgläser gegeben. Eine Probe bleibt unbelastet, eine weitere wird im Reagenzglas in siedendes Wasser 15 Sekunden lang eingetaucht, eine dritte 30 sec, eine vierte 5 min. In den einzelnen Proben müssen die gleichen Mengen an Milchserum enthalten sein, damit bei jedem Versuch die gleiche Intensität und Schnelligkeit der Wärmezufuhr gewährleistet bleibt. So benötigen 10 ml einer Lösung die doppelte Wärmemenge als 5 ml der gleichen Lösung, um die gleiche Temperatur annehmen zu können. Gleiche Mengen, bei gleicher Temperatur belastet, nehmen in der Zeiteinheit die gleiche Wärmemenge auf (1 ml Wasser benötigt zur Steigerung der Temperatur um 1 Grad C die Energie von 1 cal). Durch diese Verfahrensweise sind vergleichbare Bedingungen gegeben. Die Anfertigung der Elektropherogramme geschieht wie bei Serie II angegeben.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Eine Darstellung der Laufstrecken der I. und II. Hauptfraktion und ihrer Differenz in Prozenten der Fraktion I aus der Serie II und den Kochversuchen findet sich in Tabelle 3.

Die Ergebnisse im einzelnen

1. Der bildmäßige Vergleich der Elektropherogramme

Bei der Zerlegung der Gesamtfläche nach dem vorgenannten Verfahren lassen sich im allgemeinen zwei bis drei Vorfraktionen (a, b, c) erkennen, ferner zwei Hauptfraktionen (I u. II), dazwischenliegend eine kleine Fraktion (d), an die Fraktion II anschließend eine größere Endfraktion (e) und eine größere Schleppe (Tailing) (f).

Probenbezeichnung. Zeitangaben.

a) Vergleich zwischen Serie I und II.

Grobe Unterschiede im Gesamtbild des Elektropherogramms von der gereinigten Magermilch zum Milchserum sind nicht festzustellen. Bei der Untersuchung des Milchserums fällt ein weitgehendes Verschwinden der Schleppenbildung auf. Diese ist teilweise sehr stark ausgeprägt bei der gereinigten Magermilch. Ein Liegenbleiben von stark anfärbbaren Probenanteilen auf der Startlinie findet sich ebenfalls nur bei der gereinigten Magermilch. Das Ausmaß der liegenbleibenden Substanzen ist von Probe zu Probe außerordentlich schwankend. Damit übereinstimmend ist auch die Schleppenbildung wechselnd stark. Dieses Phänomen kann sowohl beim Vergleich von Nativproben untereinander als auch bei allen anderen Proben auftreten. Eine Folge der Hitzebelastung stellt diese Erscheinung nicht dar.⁺ Beim Kochen von Magermilch (IV, K5'-VI, K3'-VII, K5') kommt es zum Schwund aller Vorfraktionen und der I. Hauptfraktion, teilweise oder ganz, zugunsten einer ausgeprägten Schleppenbildung und einem Liegenbleiben von Proteinen auf der Startlinie, während letzteres beim Kochen von Milchserum nicht mehr festgestellt werden kann. Die Schleppenbildung bei allen Milchserumproben ist mit Ausnahme der Kochproben sehr gering. Schleppenbildung und Fixierung von Proteinen an der Startlinie stehen aber wohl in einem Zusammenhang mit der Extinktionsintensität der gewanderten Proteinfractionen. Sind viele Proteine "auf der Strecke geblieben", so bedeutet dies für die gewanderten Proteine eine geringere Ausprägung der Extinktionskurve: sie verliert an Höhe. Dabei bleiben die Proportionen der einzelnen Fraktionen zueinander innerhalb einer Charge weitgehend gewahrt. Das heißt mit anderen Worten, daß ein Haftenbleiben von Proteinen eine Verminderung aller Fraktionen in ihren absoluten Flächenwerten zur Folge hat. Das Tailing seinerseits macht sich wiederum bemerkbar auf die Ausbildung der Endfraktion e, die innerhalb einer Charge recht verschieden ausfällt, ohne daß darin ein Anzeichen einer Hitze-

⁺ausgenommen bei Kochproben

strecke II und Differenz
(= D) in Prozent von I

II	D
81,7	18,3
83,9	16,1
77,9	22,1
75,9	24,1
69,5	30,5
78,8	21,2
78,3	21,7
81,3	18,7
78,3	21,7
69,8	30,2
77,1	22,9
76,5	23,5
71,7	28,3
72,5	27,5
65,5	34,5
70,4	29,6
73,5	26,5
69,4	30,6
67,7	32,3
72,2	27,8
76,9	23,1
80,7	19,3
78,0	22,0
82,9	17,1
76,6	23,4
80,0	20,0
83,8	16,2
75,7	24,3
90,1	9,9
87,1	12,9
91,2	8,8
76,7	23,3
90,1	9,9
87,5	12,5
90,9	9,1

schädigung zu sehen ist. So können Schwankungen im Vergleich der Nativmilch zu der trockenerhitzten Milch auftreten, die beim Vergleich zwischen Nativmilch und gefriergetrockneter Milch genauso gegeben sind. Signifikante Unterschiede ergeben sich lediglich zwischen Nativmilch, gefriergetrockneter Milch und trockenerhitzter Milch auf der einen und gekochter Milch auf der anderen Seite. Diese relativ groben Schwankungen innerhalb einer Charge ergeben sich bei den Versuchen mit Serum kaum noch. Hier entfällt die Schleppenbildung fast völlig; die Startlinie ist immer frei von Proteinen. Infolgedessen sind Schwankungen innerhalb einer Charge so gut wie nicht mehr erkennbar. Gegenüber der gereinigten Magermilch ist die Fraktion a in keinem Fall mehr nachweisbar. Bei niedrigem Proteingehalt fehlen die Fraktionen b und c ebenfalls, desgleichen die Zwischenfraktion d. Die Endfraktion e ist nur noch in einer Charge nachweisbar. Es ist möglich, daß II und e sich zusammen in einer Fraktion überlagern.

b) Vergleich der Chargenanteile untereinander.

Wegen der Schwankungen der Bilder in der Serie I sollen hier hauptsächlich die Chargen der Serie II betrachtet werden. Die Fraktion a fehlt in allen Chargen oder ist in der Fraktion b enthalten. Gelegentlich kann nach dem trockenen Erhitzen von 3 Std. Dauer ein Anschwellen der Fraktion c zu Ungunsten von b eintreten, während in allen Nativmilchproben die erste der Vorfraktionen immer größer ist als die Fraktion c. Beispiel: Charge F. Eine andere, beim trockenen Erhitzen häufig wiederkehrende Erscheinung ist eine Basiserweiterung der I. Hauptfraktion mit geringfügig flacher werdender Vorderfront und einer geringen Annäherung an die II. Hauptfraktion, wobei die Zwischenfraktion d abnimmt oder ganz verschwindet.

Abb. 4

Mit diesen Beobachtungen ist aber das Maß der erkennbaren Veränderungen, die nach trockenem Erhitzen auf 100° C nach 3 Std. zu beobachten sind, erschöpft.

c) Veränderungen beim Kochen im Vergleich zum Nativmilchserum.

Eine Belastung von 15 sec. verändert das Elektropherogramm tiefgreifend: Die erste Hauptfraktion bleibt zunächst unverändert. Dafür nimmt die zweite Hauptfraktion erheblich ab und erfährt eine Beschleunigung ihrer Wandergeschwindigkeit in Richtung der I. Hauptfraktion. Die Zwischenfraktion verschwindet. Das Tailing im Anschluß an die II. Hauptfraktion nimmt erheblich zu. Die Startlinie bleibt frei. Eine 30-sec-Belastung zeigt einen beginnenden Schwund der Fraktion I, einen weiteren der Fraktion II und eine Zu-

Abb. 5

nahme der Schleppe. Die 5-min-Belastung ist praktisch ohne Vorfraktion und läßt einen weitgehenden Schwund und eine Verschmelzung der Fraktion I mit der Fraktion II erkennen. Die Schleppenbildung hat deutlich zugenommen. In den Kochproben der Serie I sind diese mit steigender Belastung kontinuierlich zunehmenden Verschiebungen der Proteinfractionen im Elektropherogramm noch weiter gediehen und haben eine völlige Verschmelzung der Fraktion I mit der II. Fraktion ergeben; es ist nicht nur zur Ausbildung einer enormen Schleppenbildung gekommen, sondern zusätzlich noch zu einer Fixierung von Proteinen auf der Startlinie.

Bereits die Vorbereitungen der Serumproben ergeben deutliche Unterschiede der Kochproben zu den Nativmilchserumproben: Das Serum der Nativmilch erscheint völlig klar. Nach 15 sec Erhitzen im kochenden Wasserbad nimmt das Serum eine deutliche Opaleszenz an, die sich nach weiteren 15 sec verstärkt. Erst nach 30 sec beginnt die Kochprobe zu sieden. Nach 5 min hat das Serum eine weiße Farbe angenommen, zeigt aber keine Ausflockung. Dagegen zeigt sich das Serum, welches aus 3 Std. lang erhitzter Trockenmilch sich gewinnen läßt, gegenüber dem Nativmilchserum unverändert.

Abb. 6

Es sei darum folgendes festzuhalten: Veränderungen, die sich nach 3-stündigem trockenen Erhitzen einstellen, sind außerordentlich geringfügig im Vergleich zur Nativmilch und sind nicht obligat. Schwankungen im elektrophoretischen Bild, die sich im Vergleich der Nativmilch zu der trockenerhitzten Milch ergeben, sind nicht größer, als sie sich beim Vergleich von Nativmilch mit gefriergetrockneter Milch ergeben. Diese Veränderungen stehen in gar keinem Verhältnis zu denen, die sich infolge Erhitzen in feuchtem Milieu einstellen. Nach 15 sec hat das Serum (5 ml) kaum 70° C erreicht. Von Kochen kann also noch nicht einmal die Rede sein. Die Grenze der feuchten Wärmetoleranz ist für einzelne Proteine eben überschritten und äußert sich im Elektropherogramm bereits durch tiefgreifende Verschiebungsvorgänge.

2. Die Bestimmung der oberen zeitlichen Toleranzgrenze bei 100°C Belastung

Eine Reihe von Versuchen zur Bestimmung der oberen Toleranzgrenze für die Dauer der Belastbarkeit des Trockengutes bei 100° C ließen das Aufzeigen von kontinuierlich zunehmenden Veränderungen, wie sie bei den Kochversuchen gefunden wurden, mißlingen. Wenn es zu Zerstörungen kommt, so scheint dies ziemlich unvermittelt einzutreten. Das Auftreten einer gelben oder ockerfarbenen Tönung ist gleichbedeutend mit einer erschwerten Löslichkeit. Die entsprechenden Veränderungen sind aber noch nicht so umwälzend, daß quali-

tativ ein Vergleich zu den Kochproben zu ziehen wäre, Beispiel V D 5h. Der nächste Schritt ist aber die Unlöslichkeit des erhitzten Trockengutes, die eine elektrophoretische Untersuchung unmöglich macht. Farbliche Veränderungen und Beeinträchtigung der Löslichkeit gehen erkennbaren Veränderungen im Elektropherogramm voraus oder sind parallel verlaufende Vorgänge. Solange Löslichkeit und Farbton des erhitzten Trockengutes unverändert bleiben, wird wohl mit erheblichen Veränderungen der Proteineigenschaften nicht zu rechnen sein. Insofern stellen ein unveränderter Farbton und eine gute Löslichkeit verlässliche Kriterien für die Integrität der Proteine dar.

3. Der zahlenmäßige Vergleich der Elektropherogramme

a) Vergleich zwischen Serie I und II.

Die bildmäßig erfaßbaren Unterschiede drücken sich sehr deutlich auch in Zahlen aus. Die durch Schleppenbildung und Liegenbleiben auf der Startlinie bedingte ungleichmäßige Beeinträchtigung der Konzentration der einzelnen Fraktionen, die sich von der Startlinie frontwärts in abklingendem Maße bemerkbar macht, kommt in der Hauptsache in erheblich schwankenden Relativwerten der Fraktion II und in noch stärkerem Maße in denen der Fraktion e zum Ausdruck. Zieht man die Flächensumme über die von den Schwankungen am meisten betroffenen Fraktionen II + e einschließlich des Tailing, so sind die Schwankungen innerhalb einer Charge nicht mehr so ausgeprägt. Über die Berechtigung eines solchen Vorgehens kann man sich streiten, denn Verschiebungen innerhalb einer Fraktionsgruppierung weisen auf qualitative Änderungen hin, die in der Summe der in Frage kommenden Flächen nicht erkennbar zu sein brauchen. Diese Schwankungen sind aber auch zahlenmäßig im Vergleich der Nativmilch zu der trockenerhitzten Milch nicht größer, als sie sich zwischen Nativmilch und gefriergetrockneter Milch ergeben. Ein zuverlässiger Hinweis für eine Schädigung durch trockenes Erhitzen läßt sich mit Proben aus gereinigter Magermilch nicht erbringen. - Demgegenüber läßt die relativ gute Übereinstimmung der Zahlenwerte bei der Prüfung der Milchserumchargen eine wesentlich sicherere Aussage über eventuelle Veränderungen durch trockenes Erhitzen zu. Gesamtflächen in Absolutwerten und Flächenanteilen in Relativwerten zur Gesamtfläche zeigen eine befriedigende Übereinstimmung. Die geringfügigen bildmäßigen Veränderungen der Serie II innerhalb einer Charge lassen sich in Zahlen weniger zuverlässig ausdrücken, handelt es sich doch bei den kleinen Fraktionen um Zahlenwerte, die praktisch in der Schwankungsbreite der Chargenanteile untereinander untertauchen. Zahlenmäßig läßt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Nativmilch und gefriergetrockneter Milch einerseits und trockenerhitzter Milch andererseits nicht entdecken.

b) Ganz anders verhält es sich, wenn man die Kochproben in Betracht zieht. Hier zeigen sich tiefgreifende Veränderungen auch in den Zahlenwerten mit einer umfassenden Verschiebung der Proportionen, die bildmäßig in der signifikanten Änderung der relativen Flächenwerte und in einer Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit bereits nach kürzester Belastung deutlich erkennbar sind. Derartig augenfällige Veränderungen sind nach trockenem Erhitzen niemals festzustellen.

Zusammenfassung und Diskussion

Zum Nachweis von Veränderungen, die durch trockenes Erhitzen möglicherweise zustandekommen, erscheint die "gereinigte Magermilch" nicht geeignet. Wie die Untersuchungen, die vergleichsweise mit Milchserum durchgeführt wurden, zeigen, sind die wirklich faßbaren Veränderungen, die eindeutig auf Hitzeeinwirkung zurückzuführen sind, zahlenmäßig und bildmäßig so gering, daß sie in dem stärker unterschiedlichen Gefüge der Magermilch-elektropherogramme nicht mehr zu erkennen sind. Dagegen sind die groben Änderungen, die durch ein feuchtes Erhitzen im Elektropherogramm sichtbar werden, so erheblich, daß sie in jedem Falle die methodisch bedingten Schwankungen um ein Vielfaches übersteigen. Daß solche Schwankungen innerhalb einer Charge methodische Ursachen haben, ist daraus zu ersehen, daß nach dem Kunstgriff der Milchserumherstellung in Übereinstimmung mit den SAGER'schen Untersuchungsergebnissen relevante Differenzen zu normaler und gefriergetrockneter Milch nicht mehr auftreten. Es ist möglich, daß ein Großteil der Schwankungen den vorbereitenden Maßnahmen zur Gewinnung der Magermilch zuzuschreiben ist. Vielleicht bedeutet das Buttern aus normaler, gefriergetrockneter und trockenerhitzter Milch jeweils einen ähnlichen, aber nicht gleichen Vorgang. Die Butter kann in ihrem Eiweißgehalt verschieden ausfallen, was ihr in keinem Falle anzusehen ist. Die grobe Manipulation des Ausschüttelns von Butter bietet wohl keine Garantie gegen schwankenden Gehalt der Magermilch an Proteinen. Hinzu kommt die von GRASSMANN und HANNIG (50) beschriebene unterschiedliche Adsorption einzelner Komponenten auf dem Filtrierpapier während des Elektrophoreseablaufes. Bei der üblichen Elektrophorese auf Filtrierpapierstreifen wird bei allen adsorbierbaren Stoffen die Wanderungsgeschwindigkeit durch Adsorption mehr oder weniger stark herabgesetzt, gegenüber denjenigen, die ohne Adsorption zu erwarten wäre. Es kommt dabei zu unscharfen und verwaschenen Rückfronten der Zonen, Schleppenbildung oder Tailing genannt, die einer scharfen Trennung

hinderlich sind. TURBA und ENENKEL (51) beschreiben elektroosmotische Kräfte, die sich unterschiedlich an einzelnen Komponenten des Gesamtproteins auswirken können. - Die genannten störenden Faktoren müßten sich theoretisch bei völliger Übereinstimmung der Versuchsbedingungen in gleichem Maße an den in Frage kommenden Substraten auswirken und dementsprechend zu vergleichbaren Ergebnissen führen, die ohne weiteres ein Erkennen von zerstörenden Einflüssen aufzudecken in der Lage sind. Solche übereinstimmenden Versuchsbedingungen scheinen durch die präparativen Maßnahmen zur Gewinnung der Magermilch nach vorausgegangener Gefriertrocknung und trockenem Erhitzen für die Anteile einer Charge nicht mehr gegeben zu sein. MORTON (52) beschreibt in der Kuhmilch das Vorkommen von "Milchmikrosomen", worunter Fettkörperchen, ein Lipoproteinkomplex und ein Caseinkomplex zu verstehen sind. Diese Mikrosomen werden von der Milchdrüse in die Milch freigelassen während des normalen Sekretionsprozesses und bilden teilweise untereinander Komplexe. Es darf angenommen werden, daß die Verhältnisse in der Frauenmilch ähnlich liegen. Dadurch wird es ohne weiteres verständlich, daß die einfachen präparativen Maßnahmen des Ausschüttelns und anschließenden scharfen Zentrifugierens, die zu der gereinigten Magermilch führten, je nach dem Grad der Stabilität der Verbindung zwischen den einzelnen Mikrosomen in der Magermilch ein verschiedener Gesamtproteingehalt resultiert, was sich in außerordentlichen Schwankungen der Gesamtfläche im Elektropherogramm äußert. Schleppenbildung, Liegenbleiben auf der Startlinie und der Laufstrecke betreffen hauptsächlich, wie aus der Beschreibung der Ergebnisse hervorgeht, die Fraktionen II und e. Diese entsprechen in ihrer Lokalisation dem Abschnitt des Elektropherogramms, der bei dem von KARTE (53) gefundenen Elektropherogramm von den Fraktionen V bis VII nach Seitz-Filtration eingenommen wird. Das Seitz-Filtrat entspricht weitgehend den caseinfreien Molkenproteinen. Wenn KARTE in seinen Untersuchungen über feuchte Hitzeschädigung der Frauenmilch lediglich das Seitz-Filtrat einer Prüfung unterzieht und dabei eine weitgehende Stabilität dieser Proteine feststellt, so bleibt ein wesentlicher Bestandteil der Frauenmilchproteine, nämlich das Casein, das 30 bis 37% des Gesamtproteins ausmacht, unberücksichtigt. Ein Vergleich der Elektropherogramme aus dem Seitz-Filtrat zu denen aus dem Milchserum eigener Herstellung läßt den Schluß zu, daß sich das Casein in dem Bereich der KARTE'schen Fraktionen IV bis VII lokalisiert; d. h. mit anderen Worten, daß die Fraktionen d, II und e sowie das Tailing f nicht eigentlich reine Fraktionen darstellen, sondern von einem Caseinanteil überlagert sind. Spätere Untersuchungen (Fermentuntersuchungen) bestätigen, daß in dem Milchserum eigener Herstellung das ge-

Abb. 8

samte lösliche Protein ohne Lipoproteine, also auch das Casein, enthalten sind. Ein zahlenmäßiger Vergleich scheint diesen Befund zu bestätigen. Nach KARTE beträgt der Anteil des Caseins am Frauenmilcheiweiß 30 bis 37%. In einem Zahlenbeispiel findet er im Seitz-Filtrat an relativen Prozentsätzen für die Fraktion I = 0%, II = 4,7%, III = 4,3%, IV = 45,4%, V = 14,2%, VI = 7,2%, VII = 24,2%. Eliminiert man die Fraktion IV mit rund 45%, so kann ein einigermaßen exakter Vergleich zu einem Beispiel der eigenen Serumelektrophoresen durchgeführt werden. Bei letzterer ist die entsprechende Fraktion I ziemlich genau zu bestimmen. Sie beträgt durchschnittlich 20% der Gesamtfläche. Setzt man diese 20% absolut, so ergibt sich zur Gesamtfläche ein Verhältnis 20 : 100. Setzt man auch den Wert von 45% absolut, so ergibt sich für eine entsprechende Gesamtfläche von 225 das Verhältnis 45 : 225. Eliminiert man von der Gesamtfläche 225 den Anteil der Fraktion IV mit 45, so bleibt eine Restfläche von 180. Dieser Rest setzt sich zusammen aus dem fehlenden Anteil der "Caseinfläche" und dem Absolutwert der Fraktionen II bis VII ohne IV. Dieser beträgt 55 absolut, das sind 99 der Restfläche. Subtrahiert man diese 99 von 180, so bleiben 81 absolut. Die Fläche 81 entspricht dem Caseinanteil. Dieser beträgt, bezogen auf die Gesamtfläche von 225, genau 36%. Damit bewegt sich der Caseinanteil des Milchserumproteins innerhalb der für die Frauenmilch angegebenen Grenzen von 30 - 37%. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, bleiben die Relativwerte für die Fraktion I innerhalb einer Charge relativ konstant. Die Schwankungen an den folgenden Fraktionen des Caseinbereiches scheinen in der Hauptsache auf Schwankungen des Caseingehaltes in der Magermilch zu beruhen, was durch verschieden starke Caseineinschlüsse in der Butter infolge unterschiedlicher Trennung des Caseinkomplexes von den Fettpartikeln, die ja insgesamt bei der Gewinnung der Magermilch eliminiert werden, hinreichend erklärt sein dürfte. Adsorption und elektroosmotische Faktoren sowie die Vergesellschaftung des Casein mit Fettpartikeln auch in der Magermilch dürften für die Schleppenbildung, das Liegenbleiben auf der Strecke und auf der Startlinie verantwortlich zu machen sein. Alle diese Erscheinungen können aber nicht als Folge von Zerstörungsprozessen durch trockenes Erhitzen gedeutet werden, weil sich in manchen Chargen Veränderungen, die sich im Vergleich von gefriergetrockneter zur Nativmilch ergeben, beim Vergleich von Nativmilch zu trockenerhitzter Milch nicht mehr ergeben.

Derartige Veränderungen, die in methodischen Mängeln ihre Ursache haben, finden sich bei Verwendung von Milchserum nicht wieder. Bezüglich der Gesamtflächen innerhalb einer Charge kann eine befriedigende zahlenmäßige Übereinstimmung festgestellt werden. Die beschriebenen geringfügigen, nur

bildmäßig zu erfassenden Veränderungen an den Vorfraktionen der ersten Hauptfraktion und der Zwischenfraktion lassen sich zahlenmäßig nicht mehr sicher erfassen, weil die betroffenen Fraktionen größenordnungsmäßig in den Schwankungsbereich der Methode untertauchen.

Abb. 9
u. 10

Die Seitz-Filtratelektropherogramme von KARTE sind mittels der Tiselius-Apparatur gewonnen worden. Infolgedessen ist ein Vergleich mit Papierelektropherogrammen nur bedingt zulässig. Er zeigt aber doch, daß ein wesentlicher Teil des Milchproteins durch den Vorgang der Seitz-Filtration verloren geht. Wenn das Seitz-Filtrat im wesentlichen den Molkenproteinen entspricht, dann kann es sich bei den fehlenden Proteinen in der Hauptsache lediglich um den Caseinanteil handeln.

Im übrigen scheint der Einwand KARTE's gegen die Papierelektrophorese nicht so schwerwiegend zu sein, daß sich exakte vergleichende Untersuchungen mit dieser Methode nicht durchführen ließen. Es ist im Gegenteil wahrscheinlich, daß qualitative Änderungen der Proteine noch deutlicher zutage treten als bei Benutzung der Tiselius-Apparatur. So sind beispielsweise osmotisch und adsorptiv wirksame Faktoren, die für Änderungen im Bild des Diagramms bei der Papierelektrophorese wirksam sind, im Elektropherogramm der Tiselius-Apparatur bedeutungslos, weil es solche Kräfte dort nicht gibt. Veränderungen, die durch solche Faktoren verursacht sind, treten somit bei Tiselius nicht in Erscheinung. Insofern stellt die Papierlektrophorese eine Bereicherung der qualitativen Unterscheidungsmöglichkeiten dar, weil beide zusätzliche Faktoren eine Änderung frühzeitig erkennen lassen. Die Möglichkeiten sind vielgestaltiger.

Der Vergleich der Serumelektropherogramme aus Nativmilch mit denen, die nach kürzestem feuchtem Erhitzen gewonnen werden konnten, führt zu einer genaueren Differenzierung der von der feuchten Hitzebelastung am stärksten betroffenen Proteine. Die durch feuchtes Erhitzen zuerst veränderten Proteinanteile betreffen wiederum den Anteil des Elektropherogramms, der nach den theoretischen Überlegungen dem Casein zuzuordnen ist. Diese Proteine bleiben zuerst auf der Laufstrecke liegen, ohne daß die I. Hauptfraktion die geringste Einbuße erfährt. Erst stärkere Hitzeeinwirkung zieht eine Beeinträchtigung auch der anderen Fraktionen nach sich. Die I. Hauptfraktion, die der KARTE'schen Fraktion IV entspricht, erleidet flächenmäßig eine Einbuße und verliert mit zunehmender Hitzeeinwirkung an Wanderungsgeschwindigkeit. In den nachfolgenden Fraktionen, die also als Mischfraktionen aufzufassen sind, scheint sich ein Entkoppelungsvorgang abzuspielen. Ein Teil dieses Komplexes löst sich und zeichnet sich durch eine Zunahme der Wanderungsge-

Abb. 5 u.
Tab. 2
u. 3

Tab. 3 schwindigkeit aus, was sie näher an die Fraktion I heranbringt. Der Rest erfährt eine unterschiedliche Beeinträchtigung der Wanderungsgeschwindigkeit, die sich mit steigender Hitzebelastung deutlicher bemerkbar macht. Wenn KARTE von einer unbedeutenden Veränderung der Molkenproteine durch Kochen spricht, so kann dies in etwa durch die eigenen Befunde bestätigt werden. Es muß aber das Verhalten des Casein mit in die Betrachtung einbezogen werden. Die eigenen Befunde deuten darauf hin, daß die Caseinanteile einen wesentlich hitzelabileren Bestandteil der Frauenmilch ausmachen, als ihn die Molkenproteine darstellen.

Wenn also kürzestes feuchtes Erhitzen sich durch eklatante Veränderungen an den hitzelabilen Anteilen der Proteine deutlich manifestiert, diese aber durch trockenes Erhitzen bei 100° C nicht erkennbar verändert werden, so liegt darin die wesentliche Aussage, daß sämtliche elektrophoretisch erfaßbaren Proteine in trockenem Zustand eine Hitzebelastung von 100° C über drei Stunden und mehr praktisch unverändert überstehen. Die Anwesenheit von Wasser und Wasserdampf führt zu tiefgreifend makroskopisch und elektrophoretisch erkennbaren Veränderungen.

III. Vergleichende Fermentuntersuchungen

Die vorangehenden papierelektrophoretischen Untersuchungen sollen in diesem Kapitel durch Fermentuntersuchungen quantitativer Art ergänzt werden. Prüfobjekte sind in dieser Untersuchungsserie also hochempfindliche biochemische Wirkstoffe, deren Aktivitätsminderung ein zuverlässigeres Kriterium für subtilere Proteinveränderungen darstellt, als diese aus den Elektropherogrammen zu entnehmen sind. Die vergleichende Bestimmung der Aktivität verschiedener Fermente wird im folgenden als Indikator für eintretende Zerstörungen an empfindlichen Proteinen infolge trockener Hitzebelastung gewertet. Es werden folgende Fermente vergleichsweise untersucht: Katalase (grobe Tests), alkalische Phosphatase, Milchsäuredehydrogenase (MDH) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT).

A) Orientierende Untersuchungen an der Katalase

Methodik:

Zur Untersuchung gelangen folgende Proben:

Nativmilch, abgekochte Milch, gefriergetrocknete Milch und verschieden belastete Trockenmilch.

5 ml jeder Probe werden in je ein Reagenzglas überpipettiert. Die Einstellung der für die Katalase günstigen Wasserstoffionenreaktion geschieht unter Verwendung von n/10-Essigsäure und n/10-Natronlauge auf pH 5,7. Prüfung der Wasserstoffionenkonzentration durch Auftragen eines Tropfens Lösungsgemisch auf Lyphan-Indikator L 674 (pH 4,3 - 6,1). Einstellung auf das pH-Optimum der Leberkatalase (Bedingungen s. (54)). Zugabe von 2 ml einer 3%igen Wasserstoffperoxydlösung. Sämtliche Proben kommen in einem Einsatzständer für 1/2 h bei 37° C ins Wasserbad. Die Katalase bewirkt eine Sauerstoffentwicklung, die sich durch Schaumentwicklung in der Prüfmilch kenntlich macht. Die Versuche zeigen, daß kurzes Kochen zu einer Zerstörung der Katalase führt. Dagegen sind deutliche Einschränkungen der Katalaseaktivität bei trockenem Erhitzen erst nach 3-4-stündiger Belastung festzustellen. Der Aktivitätsverlust tritt von einer gewissen Dauer der Belastung an gerechnet allmählich ein. Bei Anwendung einer geeigneten Methode an einem geeigneten Ferment muß der Grad der Funktionseinschränkung nach bestimmter Dauer der Erhitzung exakt erfaßbar sein. Die Verhältnisse sollen im folgenden an der alkalischen Phosphatase, der Milchsäuredehydrogenase und der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase studiert werden.

B) Vergleichende Prüfungen der alkalischen Phosphataseaktivität

1. Der Aufbau der Phosphatasebestimmungsmethode

Studien zur Methodik

In der Literatur konnte nur eine Methode zur Bestimmung der Phosphatasen in der Frauenmilch ausfindig gemacht werden (55). Danach ist in der Frauenmilch eine saure und eine alkalische Phosphatase vorhanden. Die pH-Optima der Phosphatasen liegen bei pH 5,1 und 9,2, das Temperaturoptimum bei 37° C. Ein Aktivator für die saure Phosphatase konnte nicht gefunden werden. Eine Aktivierung der alkalischen Phosphatase gelingt durch Magnesiumsalze. Beide Fermente spalten Hexosediphosphat gut, weniger gut die Glycerinphosphorsäure und schlecht die Pyrophosphate. Die Originaluntersuchungen wurden von GIRI (56) durchgeführt. Alle anderen Phosphatasebestimmungen in der Frauenmilch sind nach Methoden ausgeführt worden, die bei der Bestimmung der Blutserumphosphatasen Anwendung finden und speziell für diesen Zweck ausgearbeitet worden sind. Auch SAGER (57) bedient sich in seinen Untersuchungen einer für Blutserum von KING-ARMSTRONG angegebenen Methode. Spezielle Verfahren zur Bestimmung der alkalischen Milchphosphatase

(58, 59) können, wie eigene Untersuchungen gezeigt haben, nicht ohne erhebliche Modifizierung auf Frauenmilch angewandt werden. Sie sind speziell für die Kuhmilch ausgearbeitet. Ihre Anwendung scheitert an den spezifisch anderen Eigenschaften der alkalischen Kuhmilchphosphatase und an den völlig anderen Fällungsbedingungen für Eiweiß, denen man bei Prüfung der Frauenmilch gegenübersteht.

Den eigenen Untersuchungen liegt die von GIRI angegebene Methode zur Bestimmung der alkalischen Frauenmilchphosphatase (56) zugrunde.

a) Die Originalmethode nach GIRI zur Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität

Reagenzien:

- 1) n/10-Glykokollpuffer, 10 ml im Ansatz.
- 2) 2%iges Na- β -Glycerolphosphat, 5 ml im Ansatz.
- 3) Magnesiumsalz, 0,002-0,004-molare Konzentration im Ansatz.
- 4) 2 ml Frauenmilch.

Das Volumen des Ansatzes wird auf 25 ml gebracht. Die zu untersuchende Frauenmilch wird vorher, unmittelbar nach der Gewinnung, mit einigen Tropfen Toluol versetzt. Inkubation 24 Stunden bei 37° C in verschlossenen Röhrchen im Wasserbad. Nach der Inkubation werden Proben entnommen und mit der gleichen Menge 20%iger Trichloressigsäure versetzt, 30 min stehen gelassen und durch Whatmann-Filter 44 filtriert. Die Werte werden auf das Gesamtvolumen des Ansatzes umgerechnet. Der anorganische Phosphor im Filtrat wird bestimmt nach FISKE und SUBBA-ROW. - Das erforderliche pH der Substratlösung wird vor Gebrauch mit NaOH eingestellt. - pH-Optimum 9,2. Das von GIRI gefundene pH-Optimum, das Temperaturoptimum und die optimale molare Magnesium-Konzentration von 0,002-0,003 sind in der Zusammenstellung des Ansatzes bereits enthalten. Auf eine Nachprüfung wird verzichtet.

Herstellung der Reagenzien:

- 1) Glykokoll-Puffer nach SÖRENSEN (60). Der Puffer besteht aus 2 Komponenten:
 - a) 7,505 g Glykokoll und 5,85 g NaCl werden abgewogen und auf 1 Liter Aq. bidest. verdünnt.
 - b) Fixanal-NaOH, welches 1/10-Grammäquivalent enthält, wird auf 1 Liter verdünnt. Eine gebrauchsfertige 1/10-NaOH-Lösung ist hergestellt.

Zu einer vorgegebenen Menge der Lösung a wird vorsichtig unter laufender Kontrolle am pH-Meter die Lösung b zugegeben, bis das Lösungsgemisch eine Wasserstoffionenkonzentration von pH 9,2 aufweist.

- 2) Der Puffer wird auf eine 0,003-molare Magnesiumkonzentration gebracht. 0,427 g Magnesiumacetat (Molekulargewicht = 142,408) auf 1 Liter verdünnt ergibt eine 0,003-molare Konzentration. Da der Puffer (10 ml) im Ansatz eine 2,5-fache Verdünnung erfährt (Auffüllung auf 25 ml), ist der errechnete Magnesium-Acetatanteil mit 2,5 zu multiplizieren, um eine endliche Magnesiumkonzentration von 0,003 Mol im Prüfungsansatz zu erhalten.
- 3) Substratlösung: 2%iges Na- β -Glycerolphosphat (Merck). Die kristalline Substanz wird in Aq.bidest. aufgelöst: 2 g Substanz werden beispielsweise in 100 ml Aq.bidest. gelöst. Die fertige Lösung wird mit wenigen Tropfen am pH-Meter auf pH 9,2 gebracht.
- 4) Die zu untersuchende Milch wird gleich nach der Gewinnung präpariert: 5 Tropfen Toluol auf 10 ml Frauenmilch.
- 5) 20%ige Trichloressigsäure (TCE): 100 g trockene TCE werden abgewogen und in 500 ml Wasser aufgelöst. Die Lösung ist gebrauchsfertig.

Ausführung:

10 ml des alkalischen Puffers (Magnesium enthaltend) kommen in einen 25 ml-Meßkolben. Dazu kommen 2 ml präparierte Milch und 5 ml eingestellte 2%ige Substratlösung. Endlich wird mit Aq.bidest. bis zur Meßmarke aufgefüllt. Sämtliche Zusätze sind 15 min vorgewärmt. Der fertige Ansatz bleibt 24 Stunden bei 37° C im Wasserbad. Entnahme von 2 ml Ansatzlösung und Vorgabe in ein Reagenzglas mit 2 ml einer 20%igen Trichloressigsäure. 30 min stehen lassen und Filtration in 25 ml-Meßkolben zwecks Phosphatbestimmung. Phosphatbestimmung zur Zeit Null und nach 24 Stunden Inkubation.

b) Kolorimetrische Bestimmung der Phosphorsäure nach LOHMANN und JENDRASSIK (61)

Das Prinzip besteht in der Bildung von Phosphormolybdänsäure aus der in der Analysenprobe enthaltenen Phosphorsäure und dem zugesetzten Ammonmolybdat in saurer Lösung. Die entstehende Phosphormolybdänsäure wird dann durch ein zugesetztes Reduktionsmittel zu einer kolloidalen Lösung von Molybdänblau reduziert. Die auftretende Farbe ist auch schon in den allergeringsten Konzen-

trationen der Menge der vorhandenen Phosphorsäure streng proportional (LAMBERT-BEER'sches Gesetz).

Herstellung der Reagenzien:

1) 2,5%iges Ammonmolybdat in 5n-Schwefelsäure.

- a) Herstellung der 5n-Schwefelsäure aus konzentrierter Schwefelsäure, spez. Gewicht 1,836. Die Berechnung ergibt sich aus dem Molekulargewicht = 98,076. Das Molekulargewicht in Gramm an reiner konzentrierter Schwefelsäure entspricht 1 Mol. Da es sich bei der Schwefelsäure um eine 2-basische Säure handelt, sind 49,038 Gramm das Äquivalentgewicht, welches auf 1 Liter Wasser verdünnt eine n-Schwefelsäure ergibt. 5 Gramm Äquivalente ergeben die Menge konzentrierter Schwefelsäure in Gramm, welche mit Wasser auf 1 Liter verdünnt eine 5n-Schwefelsäure ergibt: 245,19 Gramm. Diese Menge wird im Wägegglas abgewogen (spitze Pipette, sehr kleiner Tropfen). Ein 1000 ml-Meßkolben wird zur Hälfte mit Aq. bidest. gefüllt und die abgewogene Schwefelsäure langsam in dünnem Strahl zu dem Wasser gegeben. Mehrmalige Nachspülung des Wägeglasses in den Meßkolben (Gefahr der Säureexplosion). Auffüllen bis zur Meßmarke mit Wasser und nach Abkühlen nochmaliges Auffüllen bis zur Marke. Die Säure ist gebrauchsfertig.
- b) Von dieser Schwefelsäure werden beispielsweise 200 ml zu einer abgewogenen Menge von 5 Gramm Ammonmolybdat zugegeben. Die Lösung des Salzes in der Säure erfolgt über 24 Std. im Wasserbad von 37° C. Nach Abkühlen ist das Reagenz gebrauchsfertig.

2) 15%ige Natrium-bisulfit-Lösung.

- a) Zur Einwaage kann lediglich Natrium-Pyrosulfit-trocken gebracht werden, welches in Wasser gelöst Na-Bisulfit ergibt. Für die 15%ige Lösung, die angestrebt wird, ergibt sich folgende Gewichtsproportion:

$$\frac{x \text{ g Pyrosulfit}}{15 \text{ g Na-Bisulfit}} = \frac{1/2 \text{ MG Pyrosulfit}}{1 \text{ MG Bisulfit}}$$

(MG = Molekulargewicht). $1/2 \text{ MG Pyrosulfit} = 95,057$; $1 \text{ MG Bisulfit} = 104,065$.

Die Proportion heißt in Zahlen ausgedrückt und nach x aufgelöst:

$x = 13,7$, d. h. 13,7 Gramm Pyrosulfit-Na entsprechen 15 Gramm Bisulfit-Na, welches nicht zur Verfügung steht. Oder: eine 13,7%ige Na-Pyrosulfitlösung entspricht einer 15%igen Na-Bisulfitlösung. Lösungsvorgang über 6 Std.

b) 20%iges Na-Sulfit. 20 Gramm Na-Sulfit werden abgewogen und in 100 ml Wasser gelöst. Lösung über 12 Std. Die Lösung ist gebrauchsfertig. Die Lösungen a und b werden getrennt aufbewahrt.

3) Amidol-Lösung.

Einwaage von 0,5 Gramm im Dunkeln aufbewahrten Amidols in eine trockene 250 ml-Flasche. In einem Meßkolben (200 ml) wird mit Na-Bisulfit bis zur Marke angefüllt. Mit einer 5 ml-Pipette (Vollpipette) werden 5 ml abgezogen = 195 ml Na-Bisulfitlösung. Dazu werden 5 ml der 20%igen Na-Sulfitlösung pipettiert. Die 200 ml Sulfit-Bisulfitlösung werden in die Flasche mit der abgewogenen Menge Amidol gegeben. Lösung 2 Std. Die Amidollösung ist gebrauchsfertig und wird im Kühlschrank im Dunkeln aufbewahrt.

Ausführung:

In einem 25 ml-Meßkolben versetzt man die zu untersuchende Lösung (Analysenprobe) mit 5 ml Ammonmolybdat-Schwefelsäure und 1 ml Amidollösung. Man füllt mit Wasser bis zur Marke auf und bringt dann die Kolben 7 min in ein Wasserbad von 37° C, danach ebenso lange in ein solches von Zimmertemperatur. Daran anschließend wird photometriert.

Phosphorsäurestandard:

Verdünnung der 0,0366-molaren Kaliumphosphatlösung (primär): 10 ml dieser Lösung mit Wasser auf 1 Liter ergibt für 1 ml der Verdünnung 0,0206 mg Phosphor. Mit dieser verdünnten Standardlösung wurde eine Eichkurve für das EPPENDORF'sche Photometer in doppelter Versuchsreihe ermittelt. E 0,032 = 0,01 mg; E 0,320 = 0,1 mg P.

Das sichere Einbringen der Versuchsansätze im 25 ml-Meßkolben in das Wasserbad gelingt durch vorheriges Einklemmen der Kolben in ein stabiles doppelbodenertes Einsatzrost.

c) Das Versagen der Eiweißfällung

Die ersten Versuche zeigen, daß mit Trichloressigsäure, gleich welcher Konzentration, eine saubere und schnelle Ausfällung des Frauenmilcheiweißes aus dem Versuchsansatz nicht möglich ist. Es kommt zu einer Teilfällung mit geringem Niederschlag. Der verbleibende Überstand erscheint außerordentlich trübe. Durch Filtration läßt sich jeweils nur der Niederschlag von dem trüben Überstand trennen. Auch die Verwendung von Hartfiltern (Blaubandfilter der Fa. SCHLEICHER & SCHÜLL) führt nicht zu der gewünschten Trennung. Dop-

pelte Filterlagen und mehrfaches Filtrieren durch das gleiche Filter und damit stufenweise Einengung der Filterporengröße ergeben noch keine restlos klare Filtratlösung. Die Durchlaufzeit kann bei Verwendung von Hartfiltern bis 40 Std. betragen. Aber selbst dann ist das Ergebnis kaum befriedigend, die Messung ungenau, da das Vorhandensein von Eiweiß in der Analysenprobe bei der Phosphatbestimmung einen grünlichen Farbton ergibt, der eine ganz andere Farbqualität ausweist, als sie durch das Vorhandensein von reinem Phosphat erzielt wird. Eine zuverlässige Eiweißfällung ist aber Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen der verschiedenen Zustandsformen der Frauenmilch im Vergleich. Rechnet man die vorbereitenden Maßnahmen (Trocknen), die Inkubationszeit und die Zeit, die zur Erzielung eines klaren Filtrates erforderlich ist, zusammen, so ergibt sich bis zur Gewinnung eines einzigen und dazu noch ungenauen Ergebnisses ein Zeitraum von einer Woche. Diese Erfahrungen bei der Verwendung von TCE als Fällungsmittel decken sich vollkommen mit denen, die KARTE (62) bei Untersuchungen über Proteinveränderungen durch Kochen und durch Säureeinwirkung machen konnte. Demzufolge erleiden die Molkenproteine der Frauenmilch, im Gegensatz zu denen der Kuhmilch, durch Zusatz von TCE lediglich Veränderungen im Sinne einer Trübung. Die geringfügigen Molekülveränderungen reichen nicht aus zur völligen Denaturierung und Ausfällung und erklären das Passieren der veränderten Proteine durch relativ feine Poren. Es ist anzunehmen, daß es sich bei den wirklich fällbaren Proteinen aus dem Vollmilchansatz um den Caseinanteil handelt. Der trübe Überstand dürfte nur noch die schwer beeinfluszbaren Molkenproteine enthalten.

Aus diesen Ausführungen ergibt sich die Notwendigkeit einer Korrektur des Verfahrens von GIRI insofern, als die Eiweißfällung des Originalverfahrens für die geplanten eigenen Untersuchungen unzureichend ist. Es ergeben sich zwei Möglichkeiten: Entweder kann auf die Fällung überhaupt verzichtet werden und der Phosphatumsatz durch Extinktionszuwachs in trüben Ansätzen gemessen werden, oder es muß eine zuverlässige Fällungsmethode gefunden werden. Beide Möglichkeiten wurden in umfangreichen Versuchsreihen erprobt.

1. Versuche zur Fällung

Weder Uranyl-Acetatlösung noch Sulfosalizylsäure noch Eßbachreagenz, in verschiedensten Konzentrationen erprobt, ergaben bezüglich der Fällungsfähigkeit ein befriedigendes Ergebnis.

2. Eine zweite Versuchsreihe sollte die Möglichkeit eines Verzichtes auf die

Fällung prüfen. Dabei konnte festgestellt werden, daß mit fortschreitender Inkubationszeit zunächst eine starke Abnahme der Extinktion bis auf ein Minimum eintritt. Nach Überschreitung des Minimumwertes kommt es dann allmählich wieder zu einem Anstieg der Extinktion. Dabei handelt es sich um einen Aufklarungsprozeß im Ansatz und vielleicht zusätzlich um eine Hydrolyse infolge Säureeinwirkung des stark sauren Molybdatreagenzzusatzes bei der Phosphatbestimmung. In Parallelversuchen ließ sich der Sachverhalt ziemlich eindeutig als Aufklarungsvorgang während der Inkubation festlegen. Ein Ansatz ohne Substrat (Fermentversuch) zeigt eine logarithmisch decrementierende Abnahme der Extinktion, die schwächer ist als während des Vollversuches, nachdem die entsprechenden Proben den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren wie die Proben des Vollversuches bei der Phosphatbestimmung (Vergleich: Vollversuch-Fermentversuch). Mehrere Substratversuche (Ansatz ohne Prüfsubstanz Milch) zeigen, daß eine Änderung durch das Substrat infolge Zersetzung nicht zu erwarten ist. Das Substrat erweist sich den Versuchsbedingungen gegenüber als stabil. Subtrahiert man die Extinktionswerte des Fermentversuches von denen des Vollversuches für entsprechende Inkubationszeiten, so ergibt sich tatsächlich eine Umsatzkurve, die dem Verlauf einer chemischen Reaktion nach dem Gesetz von GULDBERG und WAAGE entspricht (annähernd). Molybdatreagenz und Amidollösung zeigen einen zusätzlichen, aber konstanten Aufklareffekt.

Damit wäre eine Möglichkeit gefunden, um vergleichende Untersuchungen durchführen zu können. Jedoch sind die methodisch bedingten Fehler erwartungsgemäß sehr groß. Sie müssen groß sein, weil sich erstens zwei variable Meßgrößen während des Versuches fortlaufend überschneiden. Zusätzlich kommen zwei völlig verschiedene Farbqualitäten zum Vergleich: Die Proben aus dem Fermentversuchsansatz erscheinen nach Zusatz der Phosphatreagenzien in grünlicher Farbe, die aus dem Vollversuchsansatz sind anfänglich grünlich, schlagen aber mit zunehmendem Phosphatgehalt im Verlaufe der Reaktion ins Blaue um. Von einer exakten Methodik kann also noch keine Rede sein.

Auf eine Verfeinerung der Methodik wurde verzichtet, weil eine zufällige Entdeckung im Rahmen der vorgenannten Versuche die Bemühungen zur ursprünglichen Verfahrensweise determinierte: Beim Zusatz des Molybdänreagenz zu einer Ansatzprobe, der zufälligerweise etwas zögernd erfolgt ist, zeigte sich nach wenigen Tropfen ein grünblauer Niederschlag. Nach Stehenlassen wurde der Überstand wasserklar. Nach Zusatz der vollen Menge Reagenz (5 ml) löste sich der Niederschlag restlos wieder auf. Mit dieser Entdeckung hatte sich das Molybdatreagenz als Fällungsmittel angeboten.

d) Die Eiweißfällung mit Molybdatreagenz

Die günstigste Menge an Molybdatreagenz zur vollständigen Eiweißfällung aus einer 2 ml-Ansatzprobe mit Vollmilch liegt bei 0,2 ml. Bei nicht inkubierten Proben erfolgt die Fällung langsamer, im Laufe einer Stunde, bei inkubierten erfolgt sie prompt nach Reagenzzusatz.

Das Auftreten einer grünlich-grauen Farbe im Niederschlag drängt die Frage auf, ob die Fällung über freie Enden organisch gebundenen Phosphats erfolgt. Den Beweis für die Stabilität organisch gebundenen Phosphats gegenüber dem Molybdatreagenz erbringt ein Versuch mit Substratlösung (organische P-Verbindung). Eine Verbindung von Molybdän und organisch gebundenem Phosphat findet nicht statt. Ein solcher Vorgang müßte sich durch Änderung der Extinktion anzeigen. Die Extinktion bleibt aber konstant und farbliche Veränderungen, die auf einen Reaktionsablauf hindeuten würden, können nicht beobachtet werden. Daß aber das Molybdat für die Fällung verantwortlich ist und nicht die Schwefelsäure allein, zeigt ein Vergleich mit 5n-Schwefelsäure allein und Molybdatreagenz: Eine Fällung erfolgt lediglich nach Zusatz von Reagenz.

Fällungsmechanismus

Ammoniummolybdat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, bildet bei Anwesenheit von freien Phosphationen in saurem Milieu die Phosphor-Molybdänsäure:



Die Phosphormolybdänsäure ist eine komplexe Säure. Um die zentrale Phosphation-Gruppe sind 12 MoO_6 -Komplexe in Form von Oktaedern angeordnet, die durch gemeinsame O-Atome miteinander verbunden sind, je drei Oktaeder besitzen eines der Sauerstoffe des zentralen PO_4 -Komplexes gemeinsam (63). - Die Tatsache, daß nichtinkubierte Analysenproben eine verlangsamte Fällungsreaktion zeigen gegenüber der prompten Ausfällung in inkubierten Proben, deutet darauf hin, daß die Anwesenheit von anorganischem Phosphat unbedingt erforderlich ist für den Ablauf der Fällungsreaktion. Es handelt sich zunächst nicht nur um eine Säuredenaturierung, sondern zusätzlich um den Ablauf einer chemischen Reaktion im Sinne einer Komplexbindung der Phosphor-Molybdänsäure mit Proteinen. Es kommt unter Benutzung des in der Ansatzprobe vorhandenen freien Phosphats zur Bildung der Phosphor-Molybdänsäure, deren Anion negativ-elektrisch geladen ist. Diese Ladung verteilt sich gleichmäßig über die Oberfläche des Säurekomplexes. Die elektro-negative große Oberfläche ist in saurer Lösung in der Lage, Eiweißmoleküle zu noch größeren elektroneutralen Komplexen zu binden, die dann nicht mehr löslich

sind und ausfallen. Eiweißkörper spalten in saurem Milieu "diesseits" des isoelektrischen Punktes vermehrt OH-Ionen ab; sie sind also elektro-positiv geladen. In stark sauren Lösungen sind von dieser Dissoziationsverlagerung alle Eiweißkörper betroffen. Infolgedessen werden auch alle Proteine von der Fällung betroffen. Diese Ladung wird durch die elektro-negative des komplexen Phosphor-Molybdats abgesättigt. Der Säurekomplex muß also im Überschuß vorhanden sein, um alle elektro-positiven Eiweißladungen absättigen zu können. D.h. es muß genügend freies Phosphat in der Analysenprobe vorhanden sein, um eine vollständige Fällung zu erzielen.

e) Konsequenzen

Liegt in dieser Erörterung die richtige Erklärung für den Fällungsmechanismus, so müssen sich aus ihr eine Reihe von beweisbaren Konsequenzen ergeben:

- 1) Der Verbrauch an anorganischem Phosphat ist direkt proportional dem Eiweißgehalt der Analysenprobe.
- 2) Nichtinkubiertes Milchprotein kann aus dem Ansatz bei entsprechend niederem Phosphatgehalt nicht restlos gefällt werden. Evtl. zurückbleibende Trübung im Filtrat kann einen höheren Leerwert bei der Photometrie vortäuschen.
- 3) Bei Reaktionsbeginn dürfte nur wenig oder gar kein freies Phosphat nachweisbar sein (Leer-Wert), weil der größte Teil oder das gesamte vorhandene Phosphat, welches mit der Milch in den Ansatz gebracht wird, mit dem gefällten Eiweiß ausgefallen ist.
- 4) Die Bestimmung der Aktivität (Null-Wert) darf nicht eher beginnen, bis durch den Reaktionsablauf genügend Phosphat gespalten worden ist, damit die Fällung restlos und prompt erfolgen kann. Diese Erkenntnis ist die wesentlichste Konsequenz, die sich aus den bisherigen Versuchen und Überlegungen ergeben hat. Erfahrungsgemäß ist eine Inkubationsdauer von 3 Stunden "Vorinkubation" erforderlich, um eine rasche und vollständige Fällung zu erzielen. Wie spätere Untersuchungen und Berechnungen zum Studium des Reaktionsablaufes für Milchserum ergeben, liegt der erforderliche Phosphatgehalt zur Ausfällung von Milchserumeiweiß aus 2 ml Frauenvollmilch bei knapp über 0,02 mg Phosphat in einer 2 ml-Ansatzprobe, für den gesamten 25 ml-Ansatz also um 0,5 mg Phosphat. In dieser Konzentration kann von einer Verfälschung der Meßwerte durch Reaktionshemmung infolge eines erhöhten Anfangsgehaltes an Reaktionsprodukt noch nicht die Rede sein. Für Vollmilch-Ansatzproben liegt der erforderliche Phosphatgehalt der Analysenprobe etwas höher, weil die gelösten Lipide und Lipoproteine der Milch nach dem gleichen Prinzip gefällt

werden wie die Proteine selber. Infolgedessen besteht bei Fällung aus dem Vollmilchansatz ein erhöhter Phosphatbedarf.

Die unter Punkt 4 genannten Gesichtspunkte machen bei Überprüfung von Reaktionen mit erwartungsgemäß niedriger Aktivität (Kochproben, Fermentversuch) ein besonderes Vorgehen erforderlich, weil das durch die Reaktion freigesetzte Phosphat unerschwerlich bleibt und samt dem Leerwert durch die Fällung verschluckt wird: Zur Zeit Null und nach Beendigung der Reaktion wird zu einer jeden Analysenprobe die gleiche Menge einer verdünnten Phosphatlösung zugesetzt und daran anschließend die Phosphatbestimmung ausgeführt. Der Phosphatverbrauch bleibt gleich; ein evtl. stattgefundener Extinktionszuwachs entfällt dementsprechend auf die Fermentaktivität.

Dieses Vorgehen gestattet auch die Nachahmung eines Reaktionsablaufs: Die verdünnte Phosphatlösung wird in einer Konzentrationsreihe ohne Ansatzprobe und in einer zweiten mit je einer 2 ml-Ansatzprobe versetzt. Dabei zeigt die vergleichende Phosphatbestimmung die gleichen Differenzen für jede entsprechende ursprüngliche Phosphatkonzentration nach Fällung und Filtration der Reihe mit nichtinkubierten Ansatzproben. Dieser Versuch zeigt, daß es einen bestimmten Phosphatsättigungspunkt gibt, von dem an mit steigender Phosphatkonzentration kein steigender Phosphatverbrauch mehr stattfindet. Er ist der Beweis für die lineare Proportionalität zwischen Eiweißgehalt der Analysenprobe und dem Verbrauch an freiem Phosphat durch die Fällung. Läßt man vorinkubieren, bis der Sättigungspunkt erreicht ist, so ergibt sich aus dem Nachahmungsversuch für die graphische Darstellung des Reaktionsablaufs eine zeitliche Verschiebung zu Ungunsten des Startpunktes der Reaktion. Der Beweis soll später analytisch-geometrisch durch Berechnung erneuert und durch eine Wolframfällung bestätigt werden.

S. Kapitel über den Reaktionsverlauf!

f) Die Photometrie am EPPENDORF-Gerät

Gemessen wird nach der logarithmischen Skala bei einem Licht von der Wellenlänge $578 \mu = 578 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$. Schichtdicke der Meßküvetten: 1 cm. Leervergleich der Küvetten vor jedem Versuch: Differenzen der Küvetten zueinander müssen dem Meßergebnis zu- oder abgerechnet werden.

Der Blindwert: Ein 25 ml-Meßkolben wird mit 10 ml Pufferlösung und 5 ml Substratlösung beschickt und mit Aq.bidest. bis zur Marke gefüllt. Von dieser Mischung, die mit dem Ansatz beim Substratversuch identisch ist, wer-

den 2 ml in einen zweiten 25 ml-Meßkolben gebracht. Dazu kommen die vorgeschriebenen Mengen Phosphatbestimmungsreagenzien. Nach Auffüllung des Kolbens bis zur Meßmarke ist die Blindwertprobe fertiggestellt. Die Fertigung der Analysenproben aus dem Ansatz erfolgt nach Entnahme von 2 ml Ansatzprobe und Filtration nach vorausgehender Fällung mit 0,2 ml Molybdatreagenz und Zusatz der erforderlichen Mengen der Phosphatbestimmungs-Reagenzien (s. Verfahren).

g) Begriffe

Zur Bestimmung einer spezifischen Aktivität, wie sie bei den eigenen Untersuchungen erforderlich ist, müssen unspezifische Reaktionen, die möglicherweise durch das Vorhandensein von organischen Phosphaten in der Milch während der Inkubation ablaufen können, entweder sicher ausgeschlossen oder exakt quantitativ erfaßt werden. Auch Substratzersetzungen im Ansatz müssen exakt festgestellt werden.

Fermentversuch: Ansatz ohne Substratlösung.

Substratversuch: Ansatz ohne Milch (Ferment).

Vollversuch: Originalansatz.

Eine Reihe von Versuchen mit verschiedenen Milchproben ließ keinerlei unspezifische Aktivität erkennen. Verschiedene Substratversuche zeigten eine unveränderte Stabilität des Na- β -Glycerolphosphats im Ansatz und während der Inkubation. Substratzersetzungen und unspezifische Aktivität können demzufolge bei allen Untersuchungen vernachlässigt werden. Die substratspezifische Aktivität kommt allein unverfälscht im Vollversuch zum Ausdruck.

h) Maß der Fermentaktivität (Eichkurve)

Als Maß für die Aktivität der Phosphatase dient der Extinktionszuwachs (ΔE), der den Unterschied der Extinktionswerte zwischen Beginn und Ende der Inkubation bezeichnet. Der aus der Eichkurve abzulesende entsprechende Phosphatzuwachs ist zunächst für die Berechnung unerheblich und auch ungenau, denn die Ablesung von der Eichkurve schließt eine erneute Fehlerquelle in sich. Die Meßwerte sind unmittelbar gewonnen und stellen Mittelwerte aus doppelten, das ΔE einen Wert aus je 4 Phosphatbestimmungen dar. Die Eichkurve ist mit einer Extinktion von 0,032 = 0,01 mg P und 0,320 = 0,1 mg P definiert.

i) Nachteile und Ungenauigkeiten bei Versuchen mit Vollmilch allein

Im Anschluß an die Inkubation mehrerer Milchproben konnten aus jeder einzelnen Probe erheblich differierende Meßergebnisse gefunden werden. Die Ansatzflüssigkeit trennt sich während der Inkubation in zwei Schichten: in eine obere mit Rahmbestandteilen und in einer untere opaleszente Schicht mit Puffer- und Substratlösung und Magermilchproteinen. Entnimmt man die Probe aus der unteren Schicht, so liegt der Phosphatgehalt regelmäßig erheblich tiefer. Schlemmt man den ganzen Ansatz vor Entnahme der Analysenprobe auf, so ist eine erhebliche Zunahme an Phosphat im Ansatz zu verzeichnen. Ansätze mit der gleichen Milch ergeben stark schwankende Ergebnisse nach gleich langer Inkubation. Eine Trennung der Milch in Magermilch und Rahm zeigt nach Ausschütteln der Butter aus dem Rahm, daß ein Großteil der alkalischen Phosphatase mit Fettstoffen, also im Rahm, vergesellschaftet ist.

Aus diesen Befunden ist ein wesentlicher Schluß erlaubt: Vollmilch ist zu vergleichenden Versuchen nicht brauchbar. Nicht einmal ein zuverlässiger Vergleich zwischen Nativmilchproben untereinander ist durchführbar. Die ungünstige Lokalisation eines Teiles der alkalischen Phosphatase in konzentrierter Umgebung von Fett verursacht offensichtlich eine Diffusionshemmung sowohl des Substrats in Fermentnähe als auch eine Hemmung der Diffusion von freiem Phosphat zurück in die Ansatzflüssigkeit. Substrathemmung und Hemmung durch Anhäufung von Reaktionsprodukt führen zu einer Hemmung der Fermentreaktion überhaupt. Schaltet man aber die Rahmbestandteile durch Zentrifugieren und Dekantieren aus der Betrachtung aus und untersucht man nur die Magermilch, so ergeben sich für die Nativmilchproben untereinander gut übereinstimmende Ergebnisse.

k) Die verschiedenen Zustandsformen im Vergleich
nach Präparation von Magermilch (Chargenversuch)

Die bloße Betrachtung der wiederaufgelösten Trockenmilchproben läßt erkennen, daß Magermilch aus Trockenproben nicht dasselbe ist wie solche aus Nativmilch. Die Magermilch aus Trockenproben erscheint heller als die aus Nativmilch unter gleichen Bedingungen (5 min Zentrifugieren bei 3000 U/min) gewonnene. Stickstoffanalysen zeigen in den Magermilchen aus Trockenproben einen niedrigeren N-Gehalt als Nativproben.

Beispiel: N: 2,156 mg, T: 2,024 mg, T3: 2,002 mg in
2 ml Magermilch.

Ob diese höheren Stickstoffwerte auf einen höheren Gehalt der Nativmagermilch an N-haltigen Lipoiden zu beziehen sind, soll hier nicht untersucht werden. Die Vermutung liegt jedenfalls nahe. Die später zu erörternden präparativen Maßnahmen mit Fettlösungsmitteln zeigen, daß die Trübung der Milch durch Lipoiden hervorgerufen wird, denn nach Entzug der Lipoiden erscheint die verbleibende Proteinlösung klar. Im Zuge der Gefriertrocknung kommt es notwendigerweise speziell bei der Nach Trocknung, die bei allen Untersuchungen bei 50° C zwecks Erreichung des erforderlichen Restwassergehaltes durchgeführt worden sind, zu Veränderungen gerade an den Lipoiden. Die isolierten Lipoiden schmelzen nämlich, wie sich leicht nachprüfen läßt, etwa bei 40°. Damit sind Veränderungen in der Löslichkeit im vorgenannten Sinne sehr wahrscheinlich. Vier Chargenversuche mit Magermilch erläutern die Verhältnisse der alkalischen Phosphataseaktivität: (Auflösung der Trockenproben im Meßkolben auf das Ausgangsvolumen, 2 ml im Ansatz)

TABELLE 6

Chargen- anteile	a	Chargen (AE) 12 Stunden Inkubation			
		b	c	d	
N	0,109	121	93	117	
T	135	145	118	150	
T4	77	81	62	87	

Abb. 11

Den Versuchen ist ohne weiteres zu entnehmen, daß in der Magermilch nach Gefriertrocknung eine höhere Fermentaktivität gefunden wird, sei es durch Aktivierung oder durch Freisetzen von Ferment zu Ungunsten der Rahmbestandteile. Die Aktivitätssteigerung erfolgt von der Stufe der Nativmilch zur Gefriertrocknung ungleichmäßig, der Abfall von der Gefriertrocknung zum trockenen Erhitzen mit großer Gleichförmigkeit. Er beträgt rund 40%. - Daraus geht hervor, daß die Magermilch als Prüfobjekt zum Vergleich der drei Zustandsformen der Milch (N, T, Tx) nicht geeignet ist. Die Versuche zeigen ferner, daß die Stickstoffbestimmung als Bezugsbasis für die Aktivität ebenfalls unbrauchbar ist. Es ist ohne Schwierigkeit einzusehen, daß zwischen Stickstoffgehalt einer Analysenprobe und der darin festgestellten Fermentaktivität nicht notwendigerweise ein Zusammenhang bestehen muß. Nachdem die Vollmilch wegen Schichtenbildung im Ansatz zur exakten totalen N-Bestimmung nicht mehr herangezogen werden kann und sich Differenzen zwischen

dem N-Gehalt von Nativmilch und Trockenmilchproben ergeben haben, wäre eine N-Bestimmung als Bezugsbasis für die Aktivität nur noch dann sinnvoll und richtig, wenn als Ergebnis einer Reinigungsprozedur das Fermentprotein allein in den Lösungen vorhanden wäre. Die in der Literatur beschriebenen Reindarstellungsmethoden von Phosphatase aus Kuhmilch sind aber außerordentlich zeitraubend, umständlich und benötigen so erhebliche Mengen an Milch, daß solche Untersuchungen für Frauenmilch praktisch nicht möglich sind. Es bleibt als Bezugsbasis für die Fermentaktivität nur noch ein gleiches Ausgangsvolumen der einzelnen Chargenproben. Vollmilch und Magermilch an sich sind aber bei Zugrundelegung von Konstanten Volumina keine vergleichbaren Prüfobjekte, weil nachweisliche Veränderungen durch die Gefriertrocknung auch Änderungen der Fermentaktivität nach sich ziehen. KIERMEIER (64) beschreibt eine höhere Wirksamkeit von Katalase und Lipase in Naturprodukten nach Einfrieren und Wiederauftauen. Diese Gefriereffekte werden durch spezielle Gefrierbedingungen wie z. B. Gefriergeschwindigkeit stark beeinflußt. STARK u. JUNG (65) finden ähnliche Effekte besonders ausgeprägt bei der alkalischen Phosphatase aus Gewebshomogenisaten. Als Erklärung solcher Effekte wird eine verbesserte Permeabilität für das Substrat angenommen. Demzufolge dürfte es sich bei dem Effekt der Aktivitätssteigerung von Fermenten durch Einfrieren und Wiederauftauen um Strukturänderungen der Fermentträger handeln. SAGER (66) findet für die Lipaseaktivität eine Abhängigkeit der Aktivitätssteigerung von der Dauer des Gefrierprozesses, dagegen konnte er Differenzen, die sich aus der Einfriergeschwindigkeit ergeben, nicht feststellen. Dies ist umso erstaunlicher, als SAGER selbst Strukturveränderungen in Abhängigkeit von der Einfriergeschwindigkeit in der Weise feststellt, daß schnelles Einfrieren keine, langsames aber stärkere Veränderungen herbeiführt. Die KIERMEIER'schen Fermentuntersuchungen stehen mit obigen Beobachtungen in Einklang, insofern als langsames Einfrieren höhere Aktivitäten ergibt als schnelles Einfrieren. Die eigenen Arbeitsbedingungen sind nach den Angaben von SAGER so gewählt (Kühlsole bei 25° oder Kältemischung bei rund 70°), daß bei den kleinen 10 ml-Proben ein schnelles Einfrieren gewährleistet ist, woraus hervorgeht, daß die Aktivitätssteigerung in der Magermilch nicht allein dem Einfrierungsvorgang zur Last gelegt werden können. Vergleichende Stickstoffproben und die Beobachtung der Schmelzbarkeit von Lipoiden bei relativ niederen Temperaturen und damit verbunden eine Strukturänderung geben einen kaum übersehbaren Hinweis, daß die Nachtrocknung bei Anwendung höherer Temperaturen für die Aktivierungsvorgänge maßgeblich mitbeteiligt sein muß. Damit ist aber immer noch kein direkter Zusammenhang zwischen Lipoidveränderungen und Aktivitätsänderung der alkalischen Phosphatase zu ersehen.

In seinen Studien über die alkalische Phosphatase der Kuhmilch findet MORTON (67) das Enzym zu 30-40% an die Butterfettkörperchen adsorbiert, also im Rahm. Der Rest befindet sich in der Magermilch. Erzeugt man aus dem Rahm Butter, so geht das Enzym in die Buttermilch. Das Butterfett selbst ist frei von Aktivität. Die Phosphatase in fettfreier Magermilch und Buttermilch befindet sich nicht in echter Lösung, sondern ist vergesellschaftet mit einem besonderen unlöslichen Lipoproteinkomplex. Wie eigene Untersuchungen zeigen (s.o.), liegen die Verhältnisse in der Frauenmilch ähnlich. Dieser Lipoproteinkomplex, der die alkalische Milchphosphatase bindet, kann durch Behandlung des wässrigen Materials (Vollmilch oder ihre Produkte) mit n- oder iso-Butanol zerschlagen werden. Die Beseitigung der Lipide geschieht durch gleichzeitige Freisetzung des Fermentes in echte Lösung. Kein anderes der organischen Lösungsmittel, die getestet wurden, bewirkte eine Freisetzung der gebundenen Phosphatase, was für eine einzigartige Fähigkeit des Butanol spricht.

Mit diesen Untersuchungen von MORTON dürfte der Zusammenhang zwischen Lipidveränderungen und Phosphataseaktivitätsänderungen eindeutig erwiesen sein.

Nachdem ein festes Volumen als einzig mögliche Bezugsbasis für die Fermentaktivität anerkannt ist, ergibt sich die Notwendigkeit, den Vergleich zwischen den drei Zustandsformen im Chargenversuch so zu gestalten, daß verschiedene Aktivierungszustände, wie sie sich durch die Gefriertrocknung und anschließende Erhitzung in unterschiedlichem Maße durch Änderung der Lipidstrukturen ergeben, völlig ausgeschaltet werden. Der einzuschlagende Weg liegt auf der Hand. Er kann nur in einer totalen Freisetzung oder Aktivierung des Fermentes in echte Lösung bestehen. Erst mit dieser Maßnahme ist es möglich, wirkliche Aussagen über evtl. eintretende Veränderungen am Ferment selbst infolge Gefriertrocknung oder trockenen Erhitzens zu machen. Alle Untersuchungen, die nicht über einen solchen Weg gehen, sind notwendigerweise nicht erfaßbaren Zufälligkeiten unterworfen.

1) Aktivierungsprobleme und Experimente (totale Aktivierung)

Die Aktivierung der Phosphatase durch Butanol allein

In drei großangelegten Versuchen soll der Grad der Aktivierbarkeit durch Butanol geprüft werden. Konzentrationsreihen von Butanol. Nach einem Vorschlag von KAY und GRAHAM (68) werden Butanol-Milch-Gemische zu einer Emulsion aufgeschüttelt und für 7 min in ein Wasserbad von 37° C gebracht. Nach Erwärmen nochmaliges Aufschütteln und Zentrifugieren. Es handelt sich jeweils um ein Zweiphasen-Gemisch, welches sich durch Zentrifugieren trennt.

Es entsteht zwischen der wässrigen Phase und der Butanolphase eine Zwischenphase von gelartiger Beschaffenheit. Diese Zwischenphase nimmt je nach Menge an Butanolzusatz verschiedene Volumina ein. Dementsprechend verhalten sich die übrigen Phasen. Zur Erläuterung der volumenmäßigen Änderung der Phasen zueinander soll Abb. 12 dienen.

Abb. 12

- a) Die wässrige Phase zeigt mit steigender Butanolkonzentration zunächst eine rasche, später eine gleichmäßige Einengung.
- b) Die Gelphase zeigt zunächst eine stark zunehmende Verbreiterung und danach eine allmähliche Verschmälerung bis auf ein Minimum.
- c) Die Butanolphase nimmt zunächst nur sehr wenig zu, steigt aber dann zu Ungunsten der Gelphase an.

Bei den Substanzen, die sich in der Gelphase befinden, handelt es sich um Stoffe mit "amphoteren" Charakter, bezüglich ihrer Löslichkeit in Fettlösungsmitteln einerseits und Wasser andererseits. Sie müssen also einen lipophilen und einen hydrophilen Baubestandteil haben. Je nach dem Grad ihrer Fettlöslichkeit binden sie mehr Butanol und gelangen nach Zentrifugieren in die Nähe der reinen Butanolphase, oder sie binden mehr Wasser und gelangen in die Nähe der wässrigen Phase. Setzt man extrem viel Butanol zur Milch, so fällt die gesamte Gelphase mit den Proteinen der ursprünglich klaren wässrigen Phase zusammen aus. Butanol und eiweißfreie Phase trennen sich nach Zentrifugieren im Überstand. Es handelt sich um wasserunlösliche Lipide. Nach Dekantieren des Überstandes und Erwärmung des trockenen Rückstandes verflüssigen sich diese Substanzen. Sie erweisen sich als wasserunlöslich. Ein Teil dieser Substanzen löst sich im Butanol. Nach Gewinnung der Butanolphase und Erkalten derselben oder nach Acetonzusatz flocken die im Butanol gelösten Lipide wieder aus. Sie fühlen sich fettig-talgig an und zeichnen sich durch schneeweiße Farbe aus. Auch diese Stoffe sind durch leichtes Erwärmen schmelzbar. Den Löslichkeitsverhältnissen nach und entsprechend der Schmelzbarkeit und sonstigen fettähnlichen Eigenschaften nach zu urteilen, kann es sich bei diesen Stoffen nur um Lipide handeln.

In diesen Versuchen gelangen jeweils 2 ml der wässrigen Phase (durchsichtige, serumähnliche Flüssigkeit) in den Bestimmungsansatz. Inkubation: 12 Stunden. Die Ergebnisse finden sich in den drei folgenden Tabellen:

TABELLE 7

Chargen- anteile		Δ E nach 12 Stunden Inkubationszeit Butanol/Milch-Verhältnis				
I	0/10	2/10	4/10	6/10	8/10	10/10
N	0,095	0,119	0,142	0,163	0,139	0,167
T	90	96	114	124	120	126
T3	54	74	92	94	98	100
Relative Prozente von N						
N	100	-	-	-	-	-
T	95	81	79	76	86	76
T3	57	62	65	58	71	60
II	0/10	3/10	6/10	9/10	12/10	15/10
N	0,056	0,074	0,084	0,100	0,106	0,120
T	54	72	74	86	90	104
T3	20	24	36	32	40	42
Relative Prozente von N						
N	100	-	-	-	-	-
T	96	97	88	86	85	87
T3	36	32	43	32	33	36
III	0/10	3/10	6/10	9/10	12/10	15/10
N	0,087	0,118	0,129	0,135	0,160	0,184
T	77	108	115	128	136	147
T3	55	85	86	100	104	111
Relative Prozente von N						
N	100	-	-	-	-	-
T	89	92	89	95	85	80
T3	65	72	67	74	65	60

Vgl. mit dieser Tabelle die graphische Darstellung der Versuche I - III.

Abb. 13
a-c

Das Resultat aus den Versuchen I - III:

Im Versuch I handelt es sich um eine 2 1/2-Monate gefroren gelagerte Milch. Die Milch des II. Versuches war 4 Monate gefroren gelagert. Im III. Versuch kam frische Milch nach vorherigem Einfrieren zur Untersuchung. Die Extinktionszunahmen in allen Kurven setzen sich aus zwei Faktoren zusammen;

1. Einengung der wässrigen Phase mit steigender Butanolkonzentration, 2. Aktivierungseffekt. Diese Faktoren können für sich aus dem Kurvenverlauf für die Extinktion nicht beurteilt werden. Betrachtet man aber die relativen Prozentsätze der Aktivität der gefriergetrockneten und trocken erhitzten Milch gegenüber der Nativmilch mit jeweils 100%, so ergibt sich folgendes: Eine Abnahme der Relativprozente ist gleichbedeutend mit einer Aktivitätssteigerung in der Nativmilch, eine Zunahme bedeutet eine relativ stärkere Aktivierung als in der Nativmilch. Parallellaufende Prozentsätze bedeuten gleichmäßige Aktivierung. Horizontal verlaufende Prozentkurven bedeuten keine Aktivierung. Daraus ergibt sich ein deutlicher Unterschied im Verhalten zwischen älterer gefroren gelagerter und frischer Milch gegenüber Butanol. Bei der älteren Milch ist die Aktivierbarkeit der alkalischen Phosphatase durch Butanol von einem relativ geringen Butanol-Milchverhältnis an nicht mehr steigerungsfähig. Dagegen ist die Aktivierbarkeit in frischer Milch bei einem Verhältnis von $15/10 = 3/1$ noch weiter steigerungsfähig. Das bedeutet, daß man bei Untersuchung frischer Milch zu diesem hohen Mischungsverhältnis greifen muß. Das Verhältnis $3/1$ ist aber ein Extremwert, der nicht bedenkenlos weiter zugunsten des Butanol verändert werden kann. Es kommt dann sehr bald zu dem eingangs geschilderten Ereignis der totalen Fällung. Der dann auftretende klumpige Niederschlag geht nicht mehr in Lösung und zeigt keinerlei Aktivität.

Den Versuchen ist ferner zu entnehmen, daß das Volumen als Bezugsbasis für die Aktivität bei Aktivierung mit Butanol allein nicht mehr brauchbar ist, weil der Einengungsprozeß der wässrigen Phase mit steigender Butanolkonzentration durch Messung nicht exakt erfaßt werden kann. Es muß also gelingen, die wässrige Phase quantitativ zu gewinnen, um sie dann auf das Ausgangsvolumen verdünnen zu können. Dieses Vorhaben stößt aber auf erhebliche Schwierigkeiten, weil über der wässrigen Phase die spezifisch leichtere, klebrige Gelphase und darüber die noch leichtere Fett-Butanolphase geschichtet ist. Die wässrige Phase ist somit dem direkten Zugriff nicht zugänglich. Zudem berücksichtigen diese Versuche nicht die Möglichkeit, daß in der Gelphase noch ein aktiver Fermentrest enthalten sein könnte. Wenn noch ein Teil des Fermentes in der Gelphase retiniert wird, dann ergibt sich eine wei-

tere Variante bei allen Versuchen zur totalen Aktivierung mit Butanol allein. Eine solche Retention ist auf Grund der folgenden Überlegung durchaus denkbar:

Butanol löst zunächst alle reinen Fette und einen Teil der Lipide. Alle diese Bestandteile der Butanolphase sind spezifisch leichter als Wasser und schwimmen infolgedessen nach Zentrifugieren der Suspension obenauf. Die amphoteren Substanzen der Gelschicht schichten sich je nach dem Grad ihrer Hydro- oder Lipophilie mehr in die Nähe der wässrigen oder der fettlöslichen Phase. Dementsprechend enthält die gesamte Schicht von unten nach oben Wasser in abnehmender Konzentration, von oben nach unten Fettlösungsmittel in abnehmender Konzentration. Entscheidend für unsere Frage ist der Wassergehalt. Da die Phosphatase wasserlöslich und durch das Butanol in echte Lösung freigesetzt worden ist, müßte es überall dort vorhanden sein, wo Wasser anwesend ist, also auch in der Gelphase. Diese Vermutung bestätigt sich im folgenden Versuch.

10 ml Frauenvollmilch werden mit 3 ml Butanol versetzt. Erwärmen im Wasserbad (37°C , 15 min). Kräftiges mehrmaliges Schütteln während des Erwärmens. Zentrifugieren bei 3000 U/min über 20 min. Die wässrige Phase wird mit einer Saugpipette vollständig entfernt und verworfen. Die gesättigte reine Butanolphase wird ebenfalls verworfen, nachdem aus ihr durch Fällung mit Aceton ein Niederschlag gewonnen wurde, der sich bei 37°C wieder verflüssigte (Lipide). Das im Zentrifugenglas verbleibende Gel wird mit einem Überschuß an Butanol gefällt, der allmählich zugesetzt wird, wobei durch zwischenzeitliches häufiges Schütteln eine Verklumpung vermieden wird. Es entsteht ein lockerer Bodensatz, dem zum Sedimentieren Zeit gelassen wird. Der Butanolüberstand wird größtenteils durch Absaugen entfernt. Mehrmaliger Zusatz von Aceton zwecks fraktionierter Auswaschung des Butanols ebenfalls unter Schütteln und Absaugen des jeweiligen Überstandes, bis der Rückstand eine hellweiße Farbe annimmt. Der letzte Überstand mit Aceton wird weitgehend verworfen und der Rückstand bei 37°C im Vakuum destilliert. Auf diese Weise gelingt es, das im Rückstand vorhandene Aceton vollständig abzdampfen. Der verbleibende Rückstand ist vollkommen trocken. Er wird mit Wasser (5 ml) aufgelöst. Obenauf schwimmt eine dünne lockere Schicht von Lipoidsubstanzen, die nicht in wässrige Lösung zu bringen sind, aber bei 37°C schmelzen. Diese Lipoidschicht wird durch grobe Filtration von dem wässrigen Eluat getrennt. Das gesamte Filtrat gelangt in den Bestimmungsansatz. 12 Stunden Inkubation. Bei der Fällung der Meßproben aus dem Ansatz zeigt sich noch ein reichlicher Eiweißniederschlag.

E (12 h) = 62 !!

Dieses Ergebnis zeigt, daß im Rückstand noch eine deutliche Fermentaktivität und eine durch Fällung gut erkennbare Menge an Proteinen in der Gelphase vorhanden ist.

Damit ist eine Fehlermöglichkeit aufgedeckt, die bei Aktivierungsversuchen mit Butanol allein nicht nur beim Vergleich von Nativmilchen untereinander, sondern auch beim Vergleich der drei Zustandsformen der Milch im Chargenversuch (N, T, T3) unkontrollierte Varianten in das Aktivierungsverfahren einschleust,

Butanol allein erweist sich nicht als voll ausreichend, weil noch immer nicht alle Variationsmöglichkeiten, die in der Milch selber gelegen sind, für den Fall ausgeschaltet sind, daß man nur das durch Butanol freigesetzte "Milchserum" der verschiedenen Proben miteinander vergleicht. Erst wenn es gelingt, das gesamte Ferment und das gesamte Protein in die wässrige Phase überzuführen, wodurch die Rückstände frei von Fermentaktivität werden müssen, ist das Aktivierungsverfahren vollkommen auf einen Vergleich zwischen den Teilen N, T, Tx einer Charge anwendbar.

In einem weiteren Versuch soll die Möglichkeit einer vollkommenen Aktivierung auf zwei Wegen im Vergleich geprüft werden. Von zwei gleichzeitig getrockneten und trocken erhitzten Milchen gelangen jeweils 4 ml zur Untersuchung: N, T, T6! (6 Std. lang erhitzte Trockenmilch). Die erste Charge wird total gefällt durch allmähliche Zugabe von Butanol. Behandlung des Bodensatzes wie im vorherigen Versuch, wodurch gezeigt werden konnte, daß mit Aceton eine Aufarbeitung des Bodensatzes möglich ist. Vollständige Filtration des Proteineluates in den Ansatz. Die zweite Charge wird so behandelt, daß die kritische Grenzkonzentration an Butanol nicht überschritten wird. Es wird eine maximale Einengung der Gelphase durch schrittweises Zusetzen von Butanol und Zentrifugieren nach jedem Zusatz erreicht. Die Butanolüberstände werden durch vorsichtiges Absaugen verworfen. Der Rest wird in den Ansatz filtriert. Nachspülen mit Wasser. Der konzentrierte Lipoidgries trennt sich von der wässrigen Phase. Ein sehr geringer Teil Butanol, der noch in der Gelschicht enthalten ist, gelangt mit in den Ansatz. Inkubation 12 h.

TABELLE 8

Chargen- anteile	ΔE (12 h)	Relative % von N
I N	0,156	100
T	147	94
T 6	111	71
II N	0,124	100
T	124	100
T 6	92	74

Auffallend ist die hohe Aktivität bei T 6!

Beide Versuche zeigen eine relativ gute Übereinstimmung der Relationen der Chargenanteile zueinander. Es scheint relativ belanglos zu sein, ob man zum Vergleich eine totale Fällung oder ein Erhaltenbleiben der wässrigen Phase anstrebt bei maximaler Einengung der Gelphase. Ein wesentlicher Unterschied ergibt sich nicht.

Eine Reihe von Versuchen mit Butanol allein zeigen aber ein sehr unterschiedliches Verhalten der verschiedenen Milchen gegenüber Butanol. Es kann festgestellt werden, daß gleiche Bedingungen für die Anwendung von Butanol bei verschiedenen Milchen nicht zum gleichen Ergebnis führen. Wahrscheinlich ist der verschiedene Rahmgehalt für die unterschiedlichen Effekte verantwortlich. Es ist also nicht möglich, Standardbedingungen für eine Aktivierungsmethode durch Butanol allein aufzustellen. Es fehlen immer noch feststehende Versuchsbedingungen, die für alle zu untersuchenden Milchen und deren Zustandsformen brauchbar sind. Die Hauptschwierigkeit bei der totalen Aktivierung liegt bis jetzt darin, daß eine scharfe Trennung der Lipide von der wässrigen Phase nicht gelingt. Damit kann die wässrige Phase auch nicht vollkommen für den Untersuchungsgang gewonnen werden. An der quantitativen Gewinnung aller Proteine ist aber alles gelegen. Die Lösung des ganzen Problems ergibt sich aus der Anwendung von Chloroform.

Chloroform ist ein Fettlösungsmittel, welches spezifisch schwerer ist als Wasser. Wenn in ihm die Lipide gelöst werden können, dann müssen sie nach Zentrifugieren unter die wässrige Phase gelangen. Damit wäre die wässrige Phase einem direkten Zugriff zugänglich und erfaßbar. - Die ersten Versuche bestätigten diese Annahme vollkommen. Durch kräftiges Schütteln von Chlo-

roform mit Milch entsteht eine intensiv weiße Emulsion, die einen weißen Niederschlag sedimentiert. Scharfes Zentrifugieren trennt die Emulsion in zwei exakt voneinander abgesetzte Phasen: eine klare wässrige Phase oben und eine Chloroformphase unten, die alle Lipide enthält. Eine wesentliche Feststellung ergibt sich aus der Anwendung verschiedener Chloroformkonzentrationen: Von einem unteren Grenzwert abgesehen, wird die wässrige Phase durch verschiedene Chloroformzusätze in ihrem Volumen nicht beeinflusst. Das Volumen der wässrigen Phase ist etwas geringer als das Ausgangsvolumen der verarbeiteten Vollmilch, weil dieser ein Teil der Rahmbestandteile, Fette und Lipide, entzogen werden.

Versuch:

Versetzt man gleiche Proben einer Milch mit verschiedenen Chloroformmengen, schüttelt alle Proben zu einer Emulsion und zentrifugiert, so sind die wässrigen Phasen volumenmäßig gleich. Von jeder wässrigen Phase kommen 2 ml in den Ansatz und werden 12 Std. inkubiert. Eine Chloroformphase (Rückstand) wird nach Dekantieren der wässrigen Phase mehrmals mit Aceton aufgeschüttelt und gewaschen. Dadurch erfolgt ein fraktioniertes Auswaschen des Chloroforms durch Aceton samt gelöster Fette. Vakuumdestillation des Acetonrückstandes. Es bleibt ein blütenweißer trockener pulvriger Rückstand übrig. Dieser wird mit Pufferlösung aufgeschlemmt und in den Ansatz filtriert. Gleiche Inkubationszeit.

Resultat in der Tabelle:

Chloroform/Milch:	10/4	15/4	10/10	2/10	4/10
ΔE (12 h) 2 ml:	0,111	,106	,128	,138	,139

Chloroform-Extrakt (wässrig) von 2/10 gesamt im Ansatz: 0,123

Der Tabelle ist zu entnehmen, daß die Fermentaktivität größenordnungsmäßig kaum durch verschieden starke Chloroformmengen beeinflusst wird. Man erkennt aber einen geringen Anstieg der Aktivität bei Überwiegen der Milch im Mengenverhältnis gegenüber dem Überwiegen der Chloroformphase. Die Aktivität im Bodensatz der Emulsion 2/10 ist etwa so groß wie die in einer 2 ml-Probe aus der wässrigen Phase der gleichen Emulsion. Die wässrige Phase beträgt etwa 8 bis 9 ml, infolgedessen ist die Aktivität in der gesamten wässrigen Phase 4-5mal größer als in der 2 ml-Probe. Die Aktivität im Chloroformextrakt macht also etwa 1/5 bis 1/4 der Aktivität der gesamten Milchprobe aus. Bei Verschiebung des Mischungsverhältnisses zugunsten des Chloro-

form muß die Aktivität im Rückstand entsprechend der Abnahme in der wässrigen Phase zunehmen.

Versuch:

Zwei gleiche Milchproben (6 ml) werden mit je 2 ml Chloroform versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Die wässrigen Phasen werden getrennt aufbewahrt. Die Rückstände werden verarbeitet wie im vorangehenden Versuch. Beide wässrigen Phasen gelangen vollständig in den Ansatz. Dem einen Ansatz wird noch der wässrige Extrakt der entsprechenden Chloroformphase zugefiltriert, der andere Bodensatzextrakt gelangt in einen besonderen Ansatz.

Ergebnis:

1) ΔE (6 h) aus wässriger Phase und Extrakt:	0,324
2) ΔE (6 h) aus wässriger Phase allein	: 0,261
aus Extrakt allein	: 0,078
zus.	: 0,339

Die Verarbeitung des Rückstandes wäre also eine Möglichkeit der totalen Aktivierung.

Damit ist aber die Fermentaktivierung durch Chloroform noch nicht ausgeschöpft. Eine Erwärmung der Emulsion auf 37° C in festverschlossenen 30 ml-Zentrifugengläsern bringt eine Steigerung der Aktivität. 3 Proben gleicher Milch-6/2-Chloroform kommen 7, 10, 20 min ins Wasserbad. Vor der Weiterverarbeitung wird jede Probe noch einmal kräftig geschüttelt. Inkubation 6 h. Die wässrigen Phasen kommen ganz in den Ansatz, die Extrakte aus den Rückständen ebenfalls.

Ergebnis:

	ΔE (6 h)		
	Dauer der Erwärmung		
	7 min	10 min	20 min
Wässrige Phase:	0,242	0,273	0,272
Rückst. -Extrakt:	0,108	0,121	0,119
Summe:	0,350	0,394	0,391

Der Versuch zeigt eindeutig, daß die Erwärmung der Chloroformmilchemulsion eine Aktivierung des Fermentes bewirkt. Das Maximum der Aktivierung ist aber bereits nach 10 min erreicht, 20 min bedeuten keinen Fortschritt. Sicherheitshalber soll in den folgenden Versuchen 15 min lang erwärmt werden. Dem Versuch ist ferner zu entnehmen, daß die Erwärmung nicht nur eine Zunahme der Aktivität in der wässrigen Phase bedeutet. Sie steigert ebenso die Aktivität im Chloroformmilieu. In allen Proben bleibt das Verhältnis Bodensatz zur wässrigen Phase mit ca. 30% konstant. Diese Tatsache hebt noch einmal die Notwendigkeit der Verarbeitung der Chloroformphase hervor.

Versuch, die Phosphatase aus der Chloroformphase durch wässrige Extraktion ganz zu gewinnen:

Zwei 10 ml-Proben Milch werden mit je 3 ml Chloroform versetzt und 15 min bei 37° C geschüttelt (fester Verschuß des Zentrifugenglases, 30 ml, überwindet den Chloroform-Dampfdruck sicher). 4 min Zentrifugieren bei 3000 U/min. Die wässrigen Phasen I werden getrennt in einem 25 ml-Meßkolben aufbewahrt. Zu jeder verbleibenden Chloroformphase werden erneut 10 ml Wasser zugesetzt. Aufschütteln wieder wie beim ersten Mal 15 min bei 37° C. Zentrifugieren wie oben. Die so gewonnene wässrige Phase II gelangt zu der entsprechenden I in den Meßkolben. Eine III. Phase wird nach Zusatz von 5 ml Wasser zur Chloroformphase in gleicher Weise gewonnen wie I und II. Die Meßkolben I und II werden mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Danach werden die Chloroformrückstände mit Aceton in üblicher Weise ausgewaschen, die Acetonüberstände verworfen und die Bodensätze vakuumgetrocknet. Trockene Bodensätze werden mit 10 ml Ansatzpuffer aufgelöst und zusammen in einen Ansatz filtriert (total). Von den 25 ml-Extrakten, die aus je 10 ml gewonnen worden sind (2,5-fache Verdünnung), gelangen 5 ml in den Ansatz. Das entspricht 2 ml fettfreier und lipoidfreier Vollmilch. Inkubation 6 Std. Phosphatbestimmung aus 2 ml-Ansatzproben. Die Aktivitäten aus den wässrigen Extrakten sind mit 5 zu multiplizieren, da nur der fünfte Teil des Gesamtextraktes zur Inkubation gelangt ist. Die Aktivität in den Rückständen I + II ist durch 2 zu dividieren.

Ergebnis:

ΔE (6 h)

Fraktionierter Extrakt: I	0,072	) · 5 =	I	0,360
(wässrige Phasen): II	0,069		II	0,345

Rückstand I + II:	0,035	: 2 =	0,0175
-------------------	-------	-------	--------

Vergleicht man den Gesamtumsatz an Phosphat im fraktionierten Extrakt in 2 ml-Ansatzproben mit dem des gesamten Rückstandes, so bleiben in diesem 5% Restaktivität. Mit diesem Verfahren ist erstmals eine eindeutige Verschiebung der Aktivität zugunsten der wässrigen Phase gelungen. Der Prozentsatz im Rückstand ist aber noch immer nicht so gering, daß er vernachlässigt werden könnte. Es ergibt sich also auch nach dieser Verfahrensweise die Notwendigkeit, alle Chloroformrückstände gesondert zu verarbeiten. Vergleichende Untersuchungen sind aber mit dieser Versuchsmethode mit guter Annäherung bereits möglich, da sich evtl. ergebende Schwankungen innerhalb der Chargen auf diese 5% verteilen.

Chargenvergleiche nach der Verfahrensweise des vorherigen Versuches:

Chargen- anteile	ΔE (12 h)	Relative % von N	Verluste (-) % Zuwachs (+)
I N	0,056	100	+ 0
T	,052	93	- 7
T 3	,043	77	- 23
II N	0,195	100	+ 0
T	,193	99	- 1
T 3	,161	82	- 18
III N	0,157	100	+ 0
T	,139	89	- 11
T 3	,127	81	- 19

Die bisher erarbeitete Methode soll so verbessert werden, daß praktisch keine Aktivität mehr im Rückstand festzustellen ist. Bei der Verarbeitung der Rückstände in der Chloroformphase mit Aceton allein kam es zur Bildung von klebrigen talgartigen Klumpen, die nicht oder kaum zu trocknen waren und bei Zugabe von Wasser nicht dispergierten. Mit der zusätzlichen Einführung von Butanol bei der Aufarbeitung der Rückstände kann das Problem der totalen Aktivierung und Überführung des Ferments in die wässrige Phase endgültig in befriedigender Weise gelöst werden.

Versuch zur totalen Aktivierung durch zusätzliche Verwendung von Butanol zur Verarbeitung der Chloroformphasen-Rückstände:

10 ml Milch und 3 ml Chloroform werden bei 37° C 15 min geschüttelt. Wässrige Phase I im 25 ml-Meßkolben aufbewahrt. Zur verbleibenden Chloroformphase kommen 10 ml Butanol. Der Rückstand läßt sich vollkommen aufschütteln. Beim Stehenlassen bildet sich ein feinflockiger Niederschlag. Der Überstand besteht aus reinem Fett-Butanol-Chloroformgemisch, aus dem sich mit Aceton kein Niederschlag mehr gewinnen läßt. Dazu kommen 10 ml Wasser. Die Extraktion wird also erst nach Butanolzusatz vorgenommen. Aufschütteln der gesamten Mischung bei 37° C 7 min. Beim Stehenlassen bildet sich aus der Emulsion eine breitere weiße Gelschicht, über ihr die fettlösliche Phase, unter ihr die wässrige Phase II. Zentrifugieren: es kommt zu einer sauberen Trennung der Schichten; die Gelschicht verschmälert sich deutlich. Die klare Butanol-Fett-Chloroform-Phase wird weitgehend durch Absaugen entfernt. Der spezifisch leichtere fettlösliche Überstand, der noch über der Wasserphase erhalten geblieben ist, wird mit Chloroform wieder spezifisch schwerer gemacht als Wasser. Dazu genügen 3 ml Chloroform. Schütteln und Zentrifugieren dieser Mischung: Der Butanol-Fettrest mit den Lipoiden gelangt unter die wässrige Phase und ist sauber von ihr getrennt. Die wässrige Phase II kann nun quantitativ gewonnen werden wie I. Der verbleibende Rückstand läßt sich nun im Gegensatz zu früheren Rückständen sehr gut verarbeiten. Er ist locker und sehr feinflockig. Es werden 10 ml Aceton zugesetzt. Diese Menge garantiert eine vollständige Fällung der verbliebenen Proteine nach Zentrifugieren, so daß diese mit Sicherheit nach Verwerfen des Aceton-Chloroform-Butanol(rest)-Überstandes noch im verbleibenden Rückstand zu finden sind. Noch zweimaliges Auswaschen des Bodensatzes mit Aceton mit Verwerfung der jeweiligen Überstände. Vakuumtrocknung bei 37° C bis zur Erhaltung eines blütenweißen Rückstandes, der sich mit Wasser zum Teil löst und an der Oberfläche fein dispergiert (Lipoide), ohne daß dazu ein Aufschütteln erforderlich ist.

Die wässrigen Phasen kommen zusammen in einen 25 ml-Meßkolben und werden durch Zugabe von Wasser bis zur Meßmarke auf das 2,5-fache verdünnt. Es handelt sich um 25 ml Milchserum, die die wasserlöslichen Substanzen von 10 ml Vollmilch enthalten. 5 ml dieses Serums kommen in den Ansatz (das entspricht den wasserlöslichen Substanzen von 2 ml Vollmilch). Das Eluat aus dem Rückstand wird vollständig in den Ansatz filtriert. Inkubation 12 Std. 2 ml Analysenproben.

Ergebnis:	ΔE (12h)	gesamt
Gesamtaktivität im Serum:	0,111 · 5	0,555
Gesamtaktivität im Rückstand:	0,007	0,007

Relative Prozente der Serumaktivität: 1,3% im Rückstand.

Dieser Prozentsatz an Aktivität im Rückstand dürfte vernachlässigbar klein sein. Selbst geringe Schwankungen, bezogen auf den Gesamtumsatz, dürfen bei Prüfung und vergleichenden Untersuchungen mit Serum, welches nach obigem Verfahren gewonnen wird, ohne Aufarbeitung des Rückstandes und Mitinkubation infolge einer 2,5-fachen Verfünnung und Inkubation nur eines Teils des Milchserums (5 ml) nicht mehr in Erscheinung treten. Ein Fehler im Gesamtgehalt von nur 1% wirkt sich bei Untersuchung des 5ten Teils im Endergebnis nur mit 0,2% aus. Eine Erhöhung der Butanolmenge auf 15 ml bei der Verarbeitung der Chloroformphase läßt die Aktivität auf weniger als 1% im Rückstand absinken.

Der Proteingehalt des Rückstandes ist nach Elution durch Fällung aus dem Ansatz kaum noch, selbst nach Stehenlassen über mehrere Stunden, zu erkennen. Während die Fällung aus den Serumansätzen mit nur dem 5ten Teil des Gesamtproteins außerordentlich massiv und abundant erscheint. Ein solcher Proteinrückstand läßt sich, wie verschiedene Versuche gezeigt haben, stickstoffanalytisch auch mit einer Mikromethode nicht mehr erfassen!

Damit ist neben der totalen Phosphataseaktivierung noch ein wesentlicher Nebeneffekt der Methodik gefunden worden: die totale Proteinaktivierung in wässrige Lösung, eine Tatsache, die alle vergleichenden Überlegungen und Schlüsse des Kapitels über die Milchserumelektrophoresen rechtfertigt. Ein exakter Vergleich auf volumetrischer Grundlage nach totaler Aktivierung der alkalischen Phosphatase (und wahrscheinlich auch aller übrigen Zellfermente, die an Zellstrukturen der Milch gebunden sind) ist mit diesem Verfahren für alle Zustandsformen möglich geworden.

Weitere Versuche zur Methodik:
Filtration des Ansatzes oder nicht?

Versuch:

Zwei 10 ml-Proben der gleichen Milch werden nach obigem Verfahren aufgearbeitet. Serum (5 ml) und das Rückstandseluat (total) werden getrennt in den Ansatz gebracht. Das Eluat des Rückstandes II wird filtriert (zur Trennung der Lipide vom Restprotein), das des Rückstandes I gelangt samt den Lipiden, die sich fein dispergieren und mit der gleichen Methodik wie alle anderen Milchproteine aus dem Ansatz fällen lassen, in den Ansatz. Inkubation 12 Std.

Ergebnis:	ΔE (12 h)	Gesamtaktivität	Relative % v. Gesamtserum
I Serum 5 ml:	0,107	0,535	-
Rückst. v. 10 ml Milch:	0,005	0,005	0,935
II Serum 5 ml:	0,105	0,525	-
Rückst. v. 10 ml Milch, filtriert:	0,006	0,006	0,952

Mit diesem Versuch ist eine klare Trennung der Lipide von den Proteinen der Chloroformrückstände bewiesen. Durch Filtration des wässrigen Eluates nach Verarbeitung des Rückstandes geht die Fermentaktivität nicht verloren. Der Versuch beweist außerdem, daß die Aktivität in den Rückständen vernachlässigbar klein ist. Die Vorbereitung der Milch kann mit der Gewinnung der II. wässrigen Phase als abgeschlossen betrachtet werden.

Ein Versuch, die Aktivität aus den Rückständen nach Butanolbehandlung mit der wässrigen Phase I zu eluieren, bringt eine Verschlechterung der Ergebnisse. Verfahren wie oben. 2 ml-Analysenproben.

Ergebnis:	ΔE (12 h)	Gesamtaktivität	Relative % v. Gesamtserum
I Serum 5 ml I + II:	0,196	0,980	-
Rückst. v. 10 ml:	0,009	0,009	0,92
II Serum 5 ml I + II:	0,186	0,930	-
Rückst. v. 10 ml:	0,031	0,031	3,33

Das Wiederaufschlemmen des Rückstandes mit dem Serum I nach Butanolbehandlung ergibt eine Verminderung der Aktivität im Serum und eine Zunahme im Rückstand. - Wäre bei diesem Versuch die totale Eluierung aus dem Rückstand geglückt, so hätte sich daraus eine Konzentration des Serums zur Milch von 1 : 1 ergeben und damit eine Verkürzung der Inkubation auf 5 Stunden statt 12 Stunden!

Summen:	I	0,980 + 0,009	=	0,989	Gesamtaktivität
	II	0,930 + 0,031	=	0,961	Gesamtaktivität
	Differenz		=	0,028	Gesamtaktivität

Diese Differenz kann durch die Fehlermöglichkeit erklärt werden, da mit der Errechnung der Gesamtaktivität der methodische Fehler bei der Einzelanalyse von vornherein mit 5 multipliziert wird. Daher sollen alle ausgeführten Berechnungen nur noch mit dem ΔE , welches einen Mittelwert aus 4 Meßwerten darstellt, direkt ausgeführt werden. Auch die Berechnung mit mg-Phosphor, die auf dem Umwege über die Eichkurve erfolgen müßte, soll wegen der Möglichkeit der Einschleppung eines vermeidbaren Fehlers nicht durchgeführt werden. Phosphatmengen sollen nur der Anschaulichkeit halber angegeben werden. Im übrigen sind die Meßwerte durch die Angaben zur Definition der Eichkurve jederzeit in mg-Phosphat umsetzbar.

Ein Modellversuch, der die Handhabung der bei den präparativen Maßnahmen verwendeten Fettlösungsmittel erläutern soll (Phasenverschiebung): vgl. den

Abb. 14

Abb. 15
a-k

2 ml einer gesättigten alkoholischen Ceres-Schwarz-Lösung (Fettfarbstoff) kommen in einen 30 ml zylindrischen Zentrifugenkolben. Es werden 3 ml Chloroform zugesetzt. Alkohol und Farbstoff lösen sich vollkommen in Chloroform. Zu dieser Mischung gelangen 10 ml Wasser. Die Alkohol-Chloroform-Phase bleibt scharf vom Wasser getrennt. Gibt man das Wasser zur alkoholischen Lösung ohne vorherigen Chloroformzusatz, so löst sich der Alkohol samt Farbstoff im Wasser auf (die alkoholische Farbstofflösung steht in diesem Versuch stellvertretend für die Lipide). Nach Chloroformzusatz ist die alkoholische Farbstofflösung nicht mehr wasserlöslich. Nach Aufschütteln der Chloroform-Alkohol-Wassermischung zu einer Emulsion und Zentrifugieren scheidet sich die wässrige Phase quantitativ ohne Verluste völlig klar wieder ab und gelangt über die fettlösliche Phase. Diese Farbstoffphase ist infolge ihres Chloroformgehaltes spezifisch schwerer als Wasser. Setzt man Butanol, 10 - 15 ml, zu und schüttelt zu einer Emulsion, so ist nach Zentrifugieren der gesamte Ce

halt der Emulsion an fettlöslichen Mitteln in das Butanol übergegangen. Die neue Phase ist spezifisch leichter als Wasser und setzt sich scharf getrennt über die wässrige Phase. Sie kann bis auf einen kleinen Rest abgesaugt werden. Die wässrige Phase bleibt unangetastet. Wenn es darum geht, die wässrige Phase quantitativ zu erhalten, wie dies bei den präparativen Maßnahmen ja gewünscht und erforderlich ist, dann darf man die fettlösliche Phase nur teilweise absaugen, denn eine vollkommene Entfernung der fettlöslichen Phase gelingt ohne Verlust der wässrigen Phase nicht. Auch in diesem Stadium bleibt die wässrige Phase klar und farblos. Der Alkohol, der sich mit Wasser vollständig mischen läßt und der den Farbstoff in die wässrige Phase als Vehikel verschleppen könnte, wird vollkommen von Butanol und Chloroform gebunden. Um die wässrige Phase dem direkten Zugriff wieder zugänglich zu machen, wird zu dem fettlöslichen Rest über ihr soviel Chloroform zugesetzt, bis der fettlösliche Rest wieder spezifisch schwerer geworden ist und nach Aufschütteln und Zentrifugieren auf den Grund unter die wässrige Phase sinkt. Nach jedem Zusatz muß gründlich geschüttelt werden, damit eine restlose Bindung der fettlöslichen Substanzen gewährleistet ist. Eine saubere Trennung der Phasen gelingt jeweils durch Zentrifugieren. Dieser Versuch kann mit guter Näherung an die in den Versuchen gegebenen Umstände zur Bestimmung der Butanol- bzw. Chloroformmengen, die zur Erreichung der Umkehr der spezifischen Gewichte erforderlich sind, herangezogen werden.

m) Die präparativen Maßnahmen im Zusammenhang, die zur Durchführung eines Chargenversuches notwendig sind (Abb. 15 a-k)

Herstellung des Milchserums

3 exakt zu pipettierende Proben von 10 ml einer Milch müssen in den Zustandsformen der Nativmilch (N), der gefriergetrockneten Milch (T) und der gefriergetrockneten, 3 Stunden bei 100° C trocken erhitzten Milch (T3) bereitgestellt werden. Eine Probe gelangt direkt zur Weiterverarbeitung in ein 30 ml-Zentrifugenglas, die beiden anderen werden in eine Blutkonservenflasche je Probe gegeben und nach dem angegebenen Verfahren gefriergetrocknet. Im Anschluß an die Gefriertrocknung gelangt eine der Trockenproben für 3 Stunden bei 100° C in den Trockenschrank (Flasche bleibt offen!). Daran anschließend Wiederauflösung der Trockenproben mit 7 ml Wasser und 3,5 ml Chloroform in geschlossener Flasche 7 min bei 37° C im Wasserbad. Der bis dahin bei 2° C im Kühlschrank aufbewahrten Nativmilchproben werden gleichzeitig 3 ml Chloroform zugesetzt; sie gelangt ebenfalls ins Wasserbad, damit für alle Proben die gleichen Bedingungen gewahrt bleiben. Der

Inhalt der Flaschen gelangt jetzt ebenfalls in Zentrifugengläser, die fest verschlossen werden (Chloroformdampfspannung!). Die Konservenflaschen werden sorgfältig mit 3 ml Wasser nachgespült. Durch horizontale Lagerung der Flasche gelingt es, die Spülflüssigkeit vollständig wiederzugewinnen. Die Flüssigkeit gelangt zu den entsprechenden Proben in die Zentrifugengläser. Die Konservenflaschen erscheinen nach dem Spülen vollkommen klar. Der Zusatz von 3,5 ml Chloroform zu den Trockenproben erwies sich als zweckmäßig, weil die Entwicklung von Chloroformdampf infolge großer Oberfläche und größerer Ausdehnungsmöglichkeit in der Konservenflasche zu einer Verflüchtigung von rd. 0,5 ml Chloroform führt.

Entfettung und Trennung von Proteinen und Lipoiden.

Die Proben in den Zentrifugengläsern werden mit Gummistopfen fest (!) verschlossen und unter kräftigem Schütteln in 2-minütigen Abständen 15 min bei 37° C im Wasserbad erwärmt. Nach Ablauf der Erwärmungszeit werden die Röhrchen für kurze Zeit schief gestellt, damit der Emulsionsschaum, der am Gummistopfen haftet, abfließen kann. Denach vorsichtiges Öffnen der Gläser nach der nach oben gerichteten Seite der schiefstehenden Gläser. Auf diese Weise geht kein Tropfen der Emulsion durch das abströmende, unter Spannung stehende Chloroformgas verloren. Abstreifen des Korken. Zentrifugieren bei 3000 U/min 8 Minuten lang. Das spezifisch schwerere Chloroform geht mit Fett und Lipoiden unter die klare wässrige Phase I. Letztere wird säuberlich in je einen 25 ml-Meßkolben pipettiert. Dies gelingt ohne Schwierigkeiten mit der Saugpipette bei schiefgehaltenem Röhrchen. Der Bodensatz ist relativ fest und beginnt bis zu einer Neigung von 45° sicher noch nicht zu fließen. Die Rückstände werden mit je 15 ml Butanol versetzt und kräftig aufgeschüttelt, bis keine Klumpen mehr sichtbar sind.

Es wird bei jedem Verschuß immer der gleiche Gummistopfen benutzt! Chloroform, Fett und Lipoide gehen in Lösung. Letztere bilden mit dem ganzen Gemisch eine instabile Suspension. Aus dieser Suspension fällt ein feinflockiger Niederschlag von Lipoiden aus. Pro Glas werden 10 ml Wasser zugesetzt. Aufschütteln zu einer neuen Emulsion und Erwärmen bei 37° C im Wasserbad 7 min lang. Die Chloroformphase ist durch den Butanolzusatz spezifisch leichter geworden als Wasser und gelangt an die Oberfläche. Phasentrennung beim Stehenlassen. Lipoidschicht zwischen wässriger und fettlöslicher Phase. Schiefstellen, Korken abnehmen und abstreifen. Zentrifugieren: saubere scharfe Trennung der Schichten. Weitgehende Entfernung der gesättigten Butanol-Fett-Chloroform-Phase durch Absaugen bis dicht an die obere Begrenzung der Lipoidschicht. Dieser Überstand geht mit 5 ml Chloroform nach Aufschütteln und

kurzem scharfem Zentrifugieren sicher unter die wässrige Phase. Die wässrige Phase II wird zu der I. in den Meßkolben überpipettiert. Die Meßkolben werden mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur exakt bis zur Marke nachgefüllt. Es handelt sich bei den Meßkolbenproben um eine Milchserumlösung von je 10 ml Vollmilch in 2, 5-facher Verdünnung.

Statt 2 ml Vollmilch (in der Originalmethode) gelangen entsprechend 5 ml Serum in den inkubationsfertigen Ansatz.

n) Der Reaktionsansatz

Milchserum, Sörensenpuffer mit Magnesium, Substratlösung und Aq. bidest. kommen getrennt für 15 min in das Wasserbad von 37° C zwecks Vorwärmung.

Inhalt der vorgewärmten Lösungen:

Milchserum:	5,0
Sörensenpuffer	10,0
Substratlösung:	5,0
Aq. bidest. ad:	25,0

Je 2 ml-Analysenproben gelangen zu Beginn und nach Beendigung der Inkubation zur Phosphatbestimmung. Sämtliche Angaben der Aktivität beziehen sich auf 2 ml-Ansatzproben, alle Berechnungen ebenfalls. Aus zwei entsprechenden Doppelproben resultiert je ein mittlerer Meßwert zu Beginn und am Ende der Reaktions- bzw. Inkubationszeit. Das ΔE errechnet sich aus den Mittelwerten (vergleichbares Maß für die Aktivität in 2 ml-Ansatzproben).

o) Die Verarbeitung der Rückstände zwecks Überprüfung der Restaktivität und des Restgehaltes an wasserlöslichen Proteinen

Zu jedem Rückstand werden 10 ml Aceton gegeben. Kräftiges Schütteln, bis der ganze Rückstand in Aceton aufgeschlemmt ist. Es bilden sich grobe bis feine Flocken, die sedimentieren. Chloroform, Restbutanol, Restfett gehen in Lösung. Lipoide und Proteine fallen aus. Der Überstand an FettlösungsmitteIn wird abgesogen bis auf einen geringen Rest. Es muß darauf geachtet werden, daß dabei keine Anteile des sehr lockeren Bodensatzes mit fortgerissen werden. Zweimaliges Nachwaschen mit je 5 ml Aceton. Vakuumtrocknung des Rückstandes zwecks Eliminierung des restlichen Acetons unter ständigem Schwenken des Röhrchens. Der trockene Niederschlag haftet mit großer Oberfläche in der unteren Hälfte des Zentrifugenglases (Versuchsanordnung s. Abb.) und ist blütenweiß. Vorsichtiges Ablassen des Vakuums, damit das trockene

Abb.16

Pulver des Rückstandes nicht abgeblasen wird. Beim Schlagen fällt das Trockenpulver von der Glaswand ab. - Zum Trockenpulver des verarbeiteten Rückstandes werden 10 ml "ansatzreifen" Sörensenpuffers gegeben. Zwecks Förderung der Auflösung wird leicht geschwenkt (nicht schütteln, weil eine Schaumbildung vermieden werden muß! Die Proteine, die für die Schaumbildung verantwortlich sind, können nur schwer wieder einer Untersuchung zugänglich gemacht werden). Die restlichen Proteine gehen in wässrige Lösung, die Lipide dispergieren zu einem feinen mattschimmernden Film an der Oberfläche. Filtrieren in einen 25 ml-Ansatzkolben, Filter 597, Sch. & Sch. und Nachspülen des Zentrifugenglases mit 5 ml Wasser. Die Spülflüssigkeit wird ebenfalls filtriert. Zusatz von 5 ml Substratlösung und Auffüllen mit Wasser bis zur Meßmarke wie beim Ansatz mit Milchserum. Inkubation.

2. Studien zum Verlauf der Phosphatasereaktion

Geometrische Analyse

Trägt man den Extinktionszuwachs ΔE nach 0, 3, 6, 9, 12 h als Funktion der Zeit h in eine Graphik, so ergibt sich daraus der Reaktionsablauf. Die graphische Darstellung zeigt auf den ersten Blick, daß die Reaktion von dem mittleren Meßwert an nach 3 Std. fast linear verläuft. Analytisch-geometrisch kann die Kurve von diesem Punkte an mit befriedigender Näherung als Gerade angesehen werden. Sucht man die Gerade, um die sich die Meßpunkte mit einer Summe der Entfernungen von ± 0 verteilen (mittlere Verteilungsgerade), so kann diese mathematisch nach folgendem Vorgehen berechnet werden: Arithmetisches Mittel der Werte für den Extinktionszuwachs (ΔE_m) und arithmetisches Mittel der entsprechenden Werte für die Zeit (h_m) ergeben die Koordinaten eines Punktes, der auf der mittleren Verteilungskurve liegen muß. Die Steigung der gesuchten Geraden ($\text{tg} \alpha_m$) ergibt sich aus den Steigungen der einzelnen Kurvenabschnitte von 3 - 12 h = 3 Abschnitte, die zur Aufstellung von linearen Gleichungen mit den Koordinaten ΔE_m und h_m benützt werden (der Nullpunkt bleibt außerhalb der Betrachtung, weil er offensichtlich keine Beziehungen zur mittleren Verteilungsgeraden hat, Koordinaten-nullpunkt). Extrapoliert man jede dieser Gleichungen gegen Null für die Zeit, so erhält man die Schnittpunkte der Kurvenabschnitte mit der Ordinate. Das arithmetische Mittel dieser Schnittpunkte ergibt den Schnittpunkt der mittleren Verteilungsgeraden auf der Ordinate. Die Steigung der gesuchten Gerade errechnet sich aus den Koordinaten der jetzt bekannten Punkte der Geraden. Damit sind alle Faktoren bekannt, die zur Aufstellung der linearen Gleichung

für die mittlere Verteilungsgerade notwendig sind. Die Gleichung lautet in allgemeiner Formulierung:

$$\Delta E = \operatorname{tg} \alpha_m (h - h_m) + \Delta E_m$$

Nach dieser Gleichung läßt sich für jede Zeit des Meßbereichs ein entsprechender Wert für ΔE errechnen. Die Differenzen aus den berechneten Werten zu den durch Messung gefundenen für ΔE ergeben in Summe ± 0 .

Das Beispiel der Charge C

Meßwerte (Doppelwerte; ME = mittlere Extinktion; notiert werden nur die Zahlen hinter dem Komma: 3 statt 0,003)

		0h	ME	3h	ME	6h	ME	9h	ME	12h	ME
I	N :	3/4	4	34/33	34	92/110	101	156/167	162	220/228	224
	T :	3/3	3	33/30	32	94/94	94	168/167	168	224/218	222
	T3:	5/3	4	16/17	17	74/74	74	138/133	136	179/193	186
		$\Delta E (0 - 3)$		$(0 - 6)$		$(0 - 9)$		$(0 - 12)$			
II	N :	30		97		158		220			
	T :	29		91		165		218			
	T3:	13		70		132		182			
		$\Delta E (0 - 3)$		$(3 - 6)$		$(6 - 9)$		$(9 - 12) ;$		$(3 - 12)$	
III	N :	30		67		61		62 ;		190	
	T :	29		62		74		53 ;		189	
	T3:	13		57		62		50 ;		169	

Abb.17 Graphische Darstellung nach der Spalte II s. Abb.17.

Aus Gründen der Darstellung und der Berechnung wird zur Wahrung der Proportionen für die Zeit 1 h der Wert 10 eingesetzt. Bei der folgenden Berechnung steht E für ΔE .

$$N: \quad E_m = \frac{30 + 97 + 158 + 220}{4} = 126,25$$

$$\underline{E_m = 126,25}$$

$$h_m = \frac{30 + 60 + 90 + 120}{4} = 75$$

$$\underline{h_m = 75}$$

Das arithmetische Mittel aller Werte für E und h stellt das erste Punktkoordinatenpaar der Verteilungsgeraden dar.

Aus den Kurvenabschnitten der Spalte III wird die jeweilige Steigung errechnet:

$$1) \quad \operatorname{tg} \alpha_1 = \frac{67}{30} ; \quad {}^{10}\log \operatorname{tg} \alpha_1 = 0,34895$$

$$2) \quad \operatorname{tg} \alpha_2 = \frac{61}{30} ; \quad \log \operatorname{tg} \alpha_2 = 0,30821$$

$$3) \quad \operatorname{tg} \alpha_3 = \frac{62}{30} ; \quad \log \operatorname{tg} \alpha_3 = 0,31527$$

Für jede Steigung wird eine Punktgleichung mit den Werten E_m und h_m aufgestellt. Jede dieser Gleichungen schneidet die Ordinate bei $h = 0$:

$$1) \quad E_{0h_1} = \operatorname{tg} \alpha_1 (-75) + 126,25 \quad 2) \quad E_{0h_2} = \operatorname{tg} \alpha_2 (-75) + 126,25$$

$$\underline{E_{0h_1} = -41,25}$$

$$\underline{E_{0h_2} = -26,25}$$

$$3) \quad E_{0h_3} = \operatorname{tg} \alpha_3 (-75) + 126,25$$

$$\underline{E_{0h_3} = -28,75}$$

Das arithmetische Mittel dieser Schnittpunkte ist der Schnittpunkt der mittleren Verteilungsgeraden auf der Ordinate:

$$E_{m0h} = \frac{-41,25 + (-26,25) + (-28,75)}{3}$$

$$\underline{E_{m0h} = -32,08}$$

$$\underline{h = 0}$$

Damit ist ein zweites Koordinatenpaar der mittleren Verteilungsgeraden gefunden. Die Steigung der Geraden ($\operatorname{tg} \alpha_m$) errechnet sich aus der Differenz der Koordinaten für E und für h wie folgt:

$$\operatorname{tg} \alpha_m = \frac{E_m - E_{m0h}}{h_m} = \frac{126,25 + 32,08}{75} ; \quad {}^{10}\log \operatorname{tg} \alpha_m = 0,32450$$

Nach der linearen Gleichung

Abb.18 $E = \operatorname{tg} \alpha_m (h - 75) + 126,25$ (vgl. Abb.18)

läßt sich nach Einsetzen der errechneten Werte für jeden Wert der Spalte II ein entsprechender Wert für die mittlere Gerade errechnen:

Sie betragen für	gemessen:	Differenzen
N: (h = 0 ; E = -32,08 = E_{m0h})	(0, 0)	
h = 30 ; E = 31,25	30,0	+ 1,25
h = 60 ; E = 94,58	97,0	- 2,42
h = 90 ; E = 157,92	158,0	- 0,08
h = 120 ; E = <u>221,25</u>	<u>220,0</u>	<u>+ 1,25</u>
Summen: 505,00	505,0	<u>+ 0,00</u>

Summe der Abweichung über der Geraden: + 2,5

Summe der Abweichung unter der Geraden: - 2,5

Summe der Abweichung in % des Mittelwertes E_m : $\frac{2,5 \cdot 100}{126,25} = 1,979\%$

Diese Prozentzahl verteilt sich auf je 2 Prüfwerte. Dementsprechend ergibt sich eine durchschnittliche Abweichung für jeden Prüfwert von rd. 1% von der mittleren Geraden. Diese Berechnung der Abweichungen ist nur bedingt als Berechnung der Fehlerbreite zu werten.

In entsprechender Weise wird die Ermittlung der Kurven für die Chargenanteile T und T3 vorgenommen.

T Errechnete Werte für:	gemessen:	Differenzen:
(h = 0 ; E = -31,75)	(0, 0)	
h = 30 ; E = 31,25	29,0	+ 2,25
h = 60 ; E = 94,25	91,0	+ 3,25
h = 90 ; E = 157,25	165,0	- 7,75
h = 120 ; E = <u>220,25</u>	<u>218,0</u>	<u>+ 2,25</u>
Summen: 503,00	503,0	<u>+ 0,00</u>

Mittlere Abweichung in % von E_m : 3%.

T3: Errechnete Werte für:	gemessen:	Differenzen:
(h = 0 ; E = -41,57)	(0, 0)	
h = 30 ; E = 14,76	13,0	+ 1,76
h = 60 ; E = 71,09	70,0	+ 1,09
h = 90 ; E = 127,41	132,0	- 4,59
h = 120 ; E = <u>183,74</u>	<u>182,0</u>	<u>+ 1,74</u>
Summen: 397,00	397,0	<u>+ 0,00</u>

Mittlere Abweichung in % von E_m : 2,4%.

Mit dieser geometrischen Analyse soll an die Überlegungen von Seite 47/48 angeknüpft werden.

Es konnte festgestellt werden, daß es für die Proteinfällung aus dem Ansatz einen Phosphatsättigungspunkt gibt, der in direkter Abhängigkeit zum Gehalt an fällbaren Substanzen in der Ansatzprobe steht und von dem aus mit zunehmender Zeit die Reaktion für die folgenden 9 bis 12 Stunden annähernd linear verläuft. Die Gleichung der mittleren Geraden gestattet zweierlei:

1. Die genaue zeitliche Bestimmung dieses Sättigungspunktes: Er ist in allen Chargenanteilen vor Ablauf von 3 Stunden Inkubationszeit erreicht (Abb. 19).
2. Die annähernd genaue Berechnung der Menge Phosphat, die über den Leerwert hinaus durch Phosphatspaltung zusätzlich bereitgestellt werden muß, um eine vollständige Proteinfällung zu ermöglichen.

Der Sättigungspunkt ist erreicht, wenn die Gerade die Abszisse schneidet; ein Maß für den Phosphatverbrauch ist der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate. Die E-Koordinate dieses Schnittpunktes gibt diesen Wert mit negativem Vorzeichen direkt wieder. Er beträgt für N -32,08, T -31,75 und T3 -41,57 als Fehlbeträge der entsprechenden 3-Stunden-Aktivitäten N 63,33, T 63,00 und T3 56,33, die als Durchschnittswerte ebenfalls der mittleren Geraden zu entnehmen sind. Diese Durchschnittswerte liegen in guter Übereinstimmung mit den durch Messung gefundenen Werten der Spalte III (3-Stunden-Aktivität). Die geometrische Analyse kann nur als ein Näherungsverfahren an den tatsächlichen Ablauf der Reaktion gewertet werden mit dem Ziel, ein Maß für die durch Fällung verbrauchte Phosphatmenge, die neben dem a priori in der Milch vorhandenen Phosphat (Leerwert) durch Phosphatspaltung für eine ausreichende Fällung noch notwendig ist, zu gewinnen. Der Negativwert bis zum Sättigungspunkt, d. h. bis zu dem Zeitpunkt, von dem an die Reaktion meßbar wird, ist somit nicht identisch mit dem Leerwert bei Reaktionsbeginn. Ein gleicher Leerwert in allen Proben einer Charge ändert an der Steigung der Geraden nichts. Theoretisch könnte eine Parallelverschiebung bei höherem Leerwert nach der positiven, bei niedrigem nach der negativen Seite der Werte für ΔE eintreten, wenn es sich bei diesen Änderungen nicht um ein Ausmaß handelt, welches sich im Sinne einer Reaktionshemmung durch Reaktionsprodukt äußert. Von solchen Schwankungen kann aber in Anbetracht der niedrigen Meßwerte keine Rede sein.

Mit Hilfe einer Wolframbfällung, die auf der Tatsache beruht, daß Wolfram im Periodischen System in der gleichen Rubrik steht wie Molybdän und somit ähnliche Eigenschaften haben muß wie dieses, lassen sich die Verhältnisse genauer klären.

Methodik: Zu einer 2 ml-Ansatzprobe kommen 2 ml einer 2%-igen Natrium-Wolframlösung in $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$. Dazu kommen 3 Tropfen 5 n-Schwefelsäure.

Mit dieser Fällungsmethode gelingt auch die Proteinfällung aus nichtinkubierten Reaktionsansätzen prompt. Das deutet darauf hin, daß die Wolframfällung, wenn überhaupt, so doch weniger Phosphat verbraucht als die Molybdänfällung. Ein Differenzversuch bestätigt diese Vermutung:

Zwei Ansätze mit nichtinkubiertem Milchserum werden mit der gleichen Menge einer stark verdünnten Phosphatlösung versetzt. In Doppelproben wird einmal mit Wolfram und einmal mit Molybdän gefällt. Filtration und Phosphatbestimmung.

	E	ME
Ergebnis:		
Wolframfällung:	0,102/,109	0,106
Molybdänfällung:	0,059/,053	0,056
	Differenz:	0,050,

ein Maß für den Phosphatverbrauch.

Vergleicht man den Extinktionswert nach Wolframfällung mit dem nach Molybdänfällung, so reicht die Differenz größenordnungsmäßig an eine 3-Stunden-Aktivität heran.

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes der Ansätze ohne Milchserum nach Zusatz der verdünnten Phosphatlösung ergibt für eine 2 ml-Probe eine mittlere Extinktion (ME) von 0,074. Vergleicht man diesen Wert mit dem nach Fällung mit Wolframlösung, so ergibt sich aus der Differenz von $0,106 - 0,074 = \text{ME } 0,032$. Somit findet man auf einem Umweg einen "Leerwert" von $0,032 = 0,01 \text{ mg Phosphat}$. Dieser Leerwert bestätigt sich sofort im Gegenversuch: Ansatz mit gleichem Milchserum wie bei obigem Versuch. Fällung mit Wolframlösung: $E = 0,037/,34$, $ME = 0,036$, mit nur geringen Abweichungen vom Differenzwert. Der Verlust an Phosphat durch Molybdänfällung (die Differenz aus der Fällung mit Wolframlösung und Molybdatreagens) setzt sich zusammen aus dem Leerwert und einem Teil der überschüssig vorhandenen Phosphatlösung. Der von der zugesetzten Phosphatlösung verbrauchte Anteil beträgt $0,050 \text{ bis } 0,032 = 0,018$ (Extinktionswert). Die geometrische Analyse erfaßt nur diesen letzten Wert (Negativwert zur Zeit Null der Inkubation), nicht aber den Leerwert. $0,074 - 0,018 = 0,056$: zieht man also den zuletzt gewonnenen Wert von dem des Phosphatansatzes ohne Serum ab, so gelangt man wieder zu dem Extinktionswert nach Fällung mit Molybdatreagens.

Konsequenzen für die Verfahrensweise

Führt man die Fällung der aus dem Ansatz entnommenen Analysenproben mit Molybdatreagenz durch, so ergibt sich daraus eine erhebliche Fehlermöglichkeit, die sich infolge Phosphatverbrauchs auf den ersten Dreistundenumsatz auswirkt. Die Auswirkung erstreckt sich nicht nur auf die ersten 3 Stunden der Inkubation, wie die Verlaufskurven der Reaktion zeigen, sondern auch auf den Umsatz während der gesamten Inkubation, wenn man den Meßwert zur Zeit Null der Inkubation in Rechnung stellt. Zur Erläuterung mag das Beispiel der Charge C noch einmal herangezogen werden.

	ΔE (0 - 12)	ΔE (3 - 12)
N:	0,220	0,190
T:	0,218	0,189
T3:	0,182	0,169

Für die erste Rubrik ergeben sich an Prozentsätzen von N für T = 99,09 und für T3 = 82,71%. Entsprechende Aktivitätsverluste: T = - 0,91% und für T3 = - 17,29%. Ein Vergleich der Aktivitätsverluste von T3 gegenüber N Abb.20 ergibt durch Einbeziehung des Zeitpunktes Null der Reaktion einerseits und der Vorinkubation und 9-Stunden-Inkubation eine Differenz von ca. 6%.

Für die zweite Rubrik ergeben sich an Prozentsätzen von N für T = 99,47% und für T3 = 88,95%. Entsprechende Aktivitätsverluste: T = - 0,53 und T3 = - 11,05%. - Die zweite Berechnung liegt also um 6% zugunsten der Aktivitätserhaltung trotz Hitzebelastung.

Die Erklärung liegt nach den geometrischen Analysen und nach den Fällungsergebnissen auf der Hand: Die Fällung verbraucht unterschiedliche, aber für den einzelnen Chargenanteil gleichbleibende Phosphatmengen. Die Reaktion wird erst dann meßbar, wenn der Phosphatsättigungspunkt für die komplette Fällung überschritten ist. Die erste Messung nach kompletter Fällung wird als Startpunkt gesetzt und der Extinktionszuwachs nach dieser ersten Messung nach 3 bis 12 Std. wird mit denen der übrigen Chargenanteile verglichen. Daraus ergibt sich für einen exakten Vergleich der Aktivität eine

1. Möglichkeit:

Vorinkubation bis zu einer kompletten Fällung in allen Chargenanteilen (diese wurde bei allen untersuchten Chargen nach 3 Std. erreicht). Die prompte und komplette Fällung dient als Kriterium für die Überschreitung des Phosphatsättigungspunktes. Die

2. Möglichkeit

besteht darin, daß man zu den 2 ml-Analysenproben aus dem Ansatz die gleichen Mengen einer verdünnten Phosphatlösung zu Beginn und nach Beendigung der Inkubation zusetzt und den Extinktionszuwachs in den einzelnen Chargen miteinander vergleicht. Jedes Nichteinhalten dieser Möglichkeiten bedeutet einen erheblichen Fehler in der Methodik (Beispiel: 6%). Die zweite Möglichkeit hat den Nachteil, daß mit dem Zupipettieren von Phosphat eine neue Fehlerquelle entsteht. Die Meßwerte differeieren um einen erheblich größeren Prozentsatz um den mittleren Meßwert aus einer Doppelprobe als bei dem ersten Verfahren der Vorinkubation. Die folgenden Untersuchungen wurden infolgedessen nach dem ersten Verfahren ausgeführt. Auch dieses Verfahren hat eine Fehlermöglichkeit: Der Endpunkt der Inkubation liegt nämlich in einem Bereich, wo die Reaktionskurve soeben beginnt, ihren "linearen" Charakter zu verlieren und allmählich in eine Horizontale überzugehen. Diese beginnende Änderung im Verlauf der Reaktion besteht aber nur andeutungsweise und ist bei allen Chargenanteilen in gleicher Weise vorhanden. Eine gewichtige Fehlermöglichkeit ist so gut wie ausgeschlossen.

Fehlerbetrachtung - Fehlermöglichkeiten:

1. Pipettieren der Milchproben bei der Einteilung von Chargenanteilen. Auf exaktes Pipettieren ist größter Wert zu legen.
2. Unterschiedlicher Restfeuchtigkeitsgehalt (Trocknungseffekt) nach Gefriertrocknung.
3. Unterschiedliches Verhalten des Ferment-Lipoidkomplexes während der Nach Trocknung.
4. Unexakte Gewinnung der wässrigen Phasen I und II.
5. Unexakte Auffüllung (Pipettierfehler) bei der Herstellung der Verdünnung des gewonnenen Milchserums auf das 2,5-Fache.
6. Fehlerhaftes Pipettieren bei der Bereitung des Reaktionsansatzes.
7. Fehlerhafte Entnahme der Analysenproben.
8. Fehlerhafte Behandlung der Phosphatproben. Filtrieren und Farbreaktion.

Mit diesen Möglichkeiten bei der Durchführung der Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase nach eigener Methode ist zu rechnen. Daß diese Möglichkeiten bei peinlicher Einhaltung der methodischen Vorschriften nicht erheblich sein können, wird durch die Berechnung der Streuung aus der geometrischen Analyse bewiesen.

TABELLE 4

Aktivität der alkalischen Phosphatase

Chargen- anteile	ΔE (9h)	Relative % von N	% Verluste (-) Zuwachs (+)	mg-P in 2 ml	mg-P in 25 ml
C N:	0,190	100,0	$\pm 0,0$	0,059	0,738
T:	,189	99,5	- 0,5	0,059	0,738
T3:	,169	89,0	-11,0	0,053	0,663
D N:	0,172	100,0	$\pm 0,0$	0,054	0,675
T:	,171	99,4	- 0,6	0,054	0,675
T3:	,139	80,8	-19,2	0,044	0,550
E N:	0,143	100,0	$\pm 0,0$	0,045	0,563
T:	,145	101,4	+ 1,4	0,046	0,575
T3:	,112	78,3	-21,7	0,035	0,438
F N:	0,159	100,0	$\pm 0,0$	0,050	0,625
T:	,157	98,7	- 1,3	0,049	0,613
T3:	,121	76,1	-23,9	0,033	0,475
G N:	0,146	100,0	$\pm 0,0$	0,046	0,575
T:	,140	95,9	- 4,1	0,044	0,550
T3:	,113	77,4	-22,6	0,035	0,438
H N:	0,124	100,0	$\pm 0,0$	0,039	0,488
T:	,119	96,0	- 4,0	0,038	0,475
T3:	,099	79,8	-20,2	0,031	0,388
J N:	0,113	100,0	$\pm 0,0$	0,035	0,438
T:	,115	101,8	+ 1,8	0,036	0,450
T3:	,109	96,5	- 3,5	0,034	0,425
K N:	0,119	100,0	$\pm 0,0$	0,038	0,475
T:	,115	96,6	- 3,4	0,036	0,450
T3:	,096	80,7	-19,3	0,030	0,375
L N:	0,248	100,0	$\pm 0,0$	0,078	0,975
T:	,248	100,0	$\pm 0,0$	0,078	0,975
T3:	,228	91,9	- 8,1	0,071	0,888
M N:	0,247	100,0	$\pm 0,0$	0,078	0,975
T:	,257	104,1	+ 4,1	0,081	1,013
T3:	,218	88,3	-11,7	0,068	0,850
Mittlere Prozentsätze:					
N:	-----	100,00	$\pm 0,00$	-----	-----
T:	-----	99,34	- 0,66	-----	-----
T3:	-----	83,88	-16,12	-----	-----

3. Ergebnisse (Tab. 4)

Vergleicht man in den Ergebnissen der Tabelle 4 die Schwankungen der Werte für entsprechende Chargenanteile untereinander, so sind diese prozentual für die gefriergetrocknete Milch unerheblich, für die trockenerhitzte Milch jedoch wesentlich größer. Sie sind zusammengekommen wesentlich größer als die methodischen Schwankungen bei der Phosphatbestimmung. Infolgedessen erscheint es erlaubt, diese Schwankungen einem unterschiedlichen Verhalten der Milchen gegenüber jeglicher Art von Belastung zur Last zu legen. Tab. 4

Bei 10 Chargenvergleichen differiert die Aktivität in der gefriergetrockneten Milch gegenüber der Nativmilch im Durchschnitt von - 0,66% mit Extremwerten von + 4,1% und - 4,1% der Aktivität in der Nativmilch. Die trockenerhitzte Milch weist gegenüber der Nativmilch einen Aktivitätsverlust von durchschnittlich - 16,12% auf mit Extremwerten von - 3,5% und - 23,9% der Aktivität in der Nativmilch.

4. Zusammenfassung und Diskussion

In dem vorliegenden Abschnitt über den Aufbau der vergleichenden Bestimmungsmethode für die alkalische Phosphataseaktivität in den drei Zustandsformen der Frauenmilch (Nativmilch, gefriergetrocknete und trockenerhitzte Milch) wird die stufenweise Aktivierung des Fermentes bis zu einem Endpunkt einer totalen Aktivierung beschrieben, die mit einer vollkommenen Freisetzung aller wasserlöslichen Proteine in einem klaren Milchserum von 2,5-facher Verdünnung einhergeht. Die Notwendigkeit dieser Verfahrensweise hat sich aus dem unterschiedlichen Verhalten des Fermentes bei Chargenversuchen mit Vollmilch und Magermilch ergeben. Der Eingriff der Gefrier-trocknung muß als Voraussetzung für die Erhitzbarkeit des Trockengutes bei 100 Grad einen Restfeuchtigkeitsgehalt von unter 1% garantieren. Infolge der technischen Möglichkeiten, die zu diesem Zweck gegeben waren (Anlage 08 G der Fa. LEYBOLD) mußte bei der Nachtrocknung eine Temperatur von 50° C angewandt werden, um den erforderlichen Trockeneffekt zu erzielen. Diese Temperatur führt aber zu einer nachweislichen Änderung des physikalischen Aggregatzustandes nicht nur der Fette, sondern auch der Lipide vom festen in den flüssigen Zustand. Die Phosphatase ihrerseits ist in der Milch nicht echt gelöst vorhanden. Sie befindet sich nach MORTON eng mit einem nach Isolierung unlöslichen Lipoidkomplex vergesellschaftet. Insofern handelt es sich bei dem untersuchten Ferment nicht um ein Lyoenzym, sondern um

ein Desmoenzym der Milch. Diese Tatsache kann nicht sonderlich verwundern, handelt es sich doch bei der Milch um ein apokrines Drüsensekret, welches durch Abschnürung und proteolytischen Zerfall eines Teiles der Milchdrüsenzelle entsteht. Mit dieser Anschauung gewinnt die Wahrscheinlichkeit, daß das Ferment auch in der Milch eine gewisse Strukturbindung beibehält, erhebliche Bedeutung. Jede Änderung an der Lipoidstruktur der Milch zieht zwangsläufig eine Änderung der Phosphataseaktivität nach sich. Durch das Verfahren der totalen Aktivierung in Verbindung mit der Freisetzung aller Proteine in wässrige Lösung wird offenbar eine vollkommene Trennung des Fermentes vom Lipoidkomplex erreicht. Die Zerschlagung der Strukturbindung des Fermentes schließt alle Zufälligkeiten aus, die in einem unkontrollierbar unterschiedlichen Aktivierungsgrad durch den Eingriff der Gefriertrocknung zum Ausdruck kommen. Solche Zufälligkeiten sind abhängig von der Beschaffenheit jeder einzelnen Milch, insbesondere von einem stark unterschiedlichen Fett- und Lipidgehalt, wie sie bei den zahlreichen Untersuchungen immer wieder beobachtet werden konnten. Ohne die präparative Maßnahme der totalen Aktivierung sind diese Zufälligkeiten im Aktivierungszustand der Phosphatase unvermeidbar und vergleichende Chargenversuche in- folgedessen unmöglich.

Vergleicht man die Ergebnisse der Versuche aus Tabelle 4 im Zusammenhang, so lassen sich folgende Erkenntnisse gewinnen:

Ein durchschnittlicher Aktivitätsverlust infolge Gefriertrocknung kann für die Phosphatase praktisch nicht nachgewiesen werden. Dagegen ist eine Einschränkung der Fermentaktivität nach trockenem Erhitzen auf 100° C für die Dauer von 3 Stunden in jedem Fall zu verzeichnen. Das Ausmaß der Fermentzerstörung beträgt im Durchschnitt - 16,12%. Die Schwankungen um diesen Mittelwert sind von - 3,5 bis - 23,9% außerordentlich groß. Die gute Übereinstimmung der Aktivitäten von Nativmilch und gefriergetrockneter Milch schließt methodische Fehler von der angegebenen Schwankungsbreite aus. In- folgedessen müssen andere Faktoren für die erheblich differierende Ferment- schädigung durch trockenes Erhitzen verantwortlich gemacht werden. In Fra- ge kommen 1. ein unterschiedlicher Restfeuchtigkeitsgehalt des Trockengut- es nach der Gefriertrocknung und 2. ein außerordentlich schwankender Fett- und Lipidgehalt der verschiedenen Ausgangsmilchen.

Zu 1: Die Aufklärung einer exakten Beziehung zwischen Restdeuchtigkeit und Fermentschädigung konnte mit Hilfe der gravimetrischen Bestimmungs- methode nicht gelingen, da diese infolge Hygroskopie des Trockengutes bei Restfeuchtigkeiten von unter 1% erheblichen Fehlermöglichkeiten unterliegt.

Zu 2: Der Schmelzprozeß von Fetten und Lipoiden ist beim Erhitzen auf 100°C begreiflicher Weise wesentlich ausgeprägter als bei der Temperatur von 50° , die bei der Nachtrocknung anzuwenden war. In diesem Fall ist, im Gegensatz zu der Nachtrocknungstemperatur, mit einer vollkommenen Lokalisationsveränderung der Lipide und Fette zu rechnen. Es darf angenommen werden, daß die flüssigen Fette und Lipide während des Erhitzens sich über die gesamte Oberfläche des feinporösen und spongiösen Trockengutes verbreiten. Dieses Zerfließen der Fettbestandteile führt zu einer Einkleidung aller Proteine im Trockengerüst. Man kann sich vorstellen, daß es auf diese Weise zu einer Schutzfunktion der Fette und Lipide für die Proteine und die übrigen organischen Bestandteile der Milch kommt. Mit einer chemischen Veränderung der Fette und Lipide selbst ist durch bloßes Schmelzen nicht zu rechnen. Es ist jedoch nicht gelungen, eine klare Beziehung zwischen Fettgehalt und Aktivitätsverlust durch Erhitzen aufzustellen. Andererseits kann es durch den Schmelzvorgang zu einer Durchtränkung des gesamten Trockengutes mit Fettbestandteilen kommen, was zu einer allseitigen intensiveren "Bindung" auch der Proteine führen kann, die a priori keine Beziehung zu den Fettbestandteilen der Milch haben. Diese Möglichkeit findet ihre Unterstützung in der Tatsache, daß das Serum von trockenerhitzter Milch gelegentlich einen sehr matten apoleszierenden Schimmer aufweist, der in keinem Fall beim Nativmilchserum zu beobachten ist. Diese Tatsache kann mit guter Begründung so erklärt werden, daß die wasserlöslichen Proteine kleinste Lipoidteilchen mit in die wässrige Phase zu reißen imstande sind. Offenbar sind die präparativen Maßnahmen nicht geeignet, diese mögliche durch Erhitzen intensivierte Lipoid-eiweiß-"Bindung" restlos zu zerschlagen. Infolgedessen kann man sich auf den Standpunkt stellen, daß es sich bei dem Aktivitätsverlust nach Erhitzen nicht wirklich um eine echte Hitzeschädigung des Fermentes handelt, sondern um einen Cachierungseffekt infolge Einschluß von Ferment in einem durch die präparativen Maßnahmen nicht mehr aufschließbaren Lipoidkomplex. Ein solcher Effekt kann mit den zur Verfügung stehenden Mitteln weder bewiesen noch widerlegt werden. Der Effekt müßte, wenn er in erheblichem Umfange eintreten sollte, im Elektropherogramm in der Weise deutlich werden, daß die Gesamtfläche merklich kleiner und eine auffallende Schleppenbildung und Liegebleiben von unlöslichen Lipoiden auf der Starlinie zu verzeichnen wäre. Angesichts der engen Bindung des Ferments an die Lipide ist für das Fermentprotein die Situation sicherlich eine andere. Jedoch entzieht sich diese Möglichkeit einer genaueren Prüfung. Da eine exakte Aufklärung der Verhältnisse nicht möglich ist, müssen die Aktivitätsverluste cum grano salis als Hitzeschädigung des Fermentes angesehen werden, wobei für die Unterschiedlich-

keit der Ergebnisse ein möglicher Cachierungseffekt und ein schwankender Restfeuchtigkeitsgehalt gemeinsam verantwortlich gemacht werden dürfen.

Ein Vergleich des 9-Stunden-Umsatzes mit den von GIRI gefundenen Phosphatmengen nach 24-ständiger Inkubation von nicht präparierter Vollmilch zeigt einen mengenmäßig gleichen Umsatz während verschiedener Inkubationszeiten. Die totale Aktivierung ist bei sonst gleichen Versuchsbedingungen dem Originalverfahren mit einer Verkürzung der Inkubationszeit im Verhältnis 9/24 zeitlich überlegen.

In einer Reihe von Kochversuchen, bei denen analog zu den Versuchen zur Prüfung von Veränderungen der Milchproteine durch Erhitzen mittels Elektrophorese verfahren worden ist, konnte festgestellt werden, daß nach feuchtem Erhitzen von Milchserum über mehr als 15 sec bei 100° C keine Aktivität mehr nachweisbar ist! Die Phosphatase scheint nach so kurzer Belastung restlos zerstört zu sein, eine Tatsache, die umso mehr an Bedeutung gewinnt, als sie gegenüber den elektrophoretischen Ergebnissen nach kürzestem Kochen eindeutig klarzustellen in der Lage ist, daß es sich bei der Phosphatase um einen Eiweißkörper handeln muß, der gegenüber feuchten Hitzebelastungen wesentlich empfindlicher reagiert als die Proteine, die elektrophoretisch nachweisbar sind. Die Funktionsänderungen der Proteine bezüglich ihrer Wanderungsgeschwindigkeit erfolgen mit steigender Belastung kontinuierlich. Die Zugehörigkeit der einzelnen Proteinfractionen kann in etwa nach 5-minütiger feuchter Hitzebelastung bei 100° C noch erkannt werden. Dagegen ist die Phosphatasefunktion nach einer Belastungsdauer, die elektrophoretisch eben erst wahrnehmbare Veränderungen verursacht, bereits restlos erloschen. Diese Gegenüberstellung der elektrophoretischen Untersuchungen mit den Kontrollen verschiedener schädigender Einflüsse auf die Wirksamkeit der alkalischen Phosphatase zeigt, wie sehr es berechtigt ist, die Wirksamkeit von Fermenten als Indikator für feinere Zerstörungsvorgänge an Proteinen infolge trockenen Erhitzens zu werten, als dies bei der weniger exakten und bei der Fülle der Milchproteine mit Überschneidungen der Fractionen verbundenen papierelektrophoretischen Methode überhaupt möglich ist. Im Vergleich zu den Vorgängen bei kürzestem feuchtem Erhitzen sind die nachweislichen Zerstörungen durch trockenes Erhitzen über lange Dauer verschwindend gering. Denaturierungserscheinungen durch trockenes Erhitzen sind, gemessen an dem außerordentlich geringen Ausmaß von Zerstörungen am Ferment der alkalischen Phosphatase, so gut wie ausgeschlossen. Angesichts dieser erheblichen Diskrepanz zwischen der enormen Empfindlichkeit des untersuchten Fermentes und der geringen Empfindlichkeit der elektrophoretisch kontrollierbaren Proteinfractionen können die sehr geringfügigen Beobachtungen

über Änderungen im Elektropherogramm nach trockenem Erhitzen fast mit Sicherheit als methodische Schwankungen identifiziert werden. Bis jetzt läßt sich summarisch feststellen, daß grobe Proteinveränderungen durch trockenes Erhitzen von gefriergetrockneter Frauenmilch nicht eintreten. Die nachweislichen geringfügigen Veränderungen betreffen lediglich empfindlichere Substanzen, die am Gesamtprotein der Milch nur einen verschwindend kleinen Anteil ausmachen. Erhaltung der Löslichkeit und der elektrophoretisch nachweisbaren Eigenschaften der Proteine und eine fast uneingeschränkte Funktionstüchtigkeit der alkalischen Phosphatase machen es außerordentlich unwahrscheinlich, daß eine trockene Hitzebelastung der Frauenmilch über 3 Stunden bei 100° C für die Milchproteine einen Verlust ihrer biologischen Wertigkeit darstellt.

C) Fermente des intermediären Stoffwechsels

Ausgehend von der Tatsache, daß die Milch durch apokrine Sekretion entsteht, liegt die Vermutung nahe, daß mit dem zerfallenden Plasma der abgeschnürten und abgestoßenen Zellteile auch die in ihnen vorhandenen Zellfermente (Fermente des intermediären Stoffwechsels) in der Milch noch aktiv gefunden werden müssen. Seitdem WARBURG das Prinzip des "optischen Tests" zur Bestimmung der Wirksamkeit solcher Fermente gefunden hat, gehören die enzymatischen Testmethoden in die Reihe der modernen biochemischen Methoden der enzymatischen Analyse. Der optische Test setzt aber eine relativ klare Lösung voraus, da eine Messung der empfindlichen Vorgänge im trüben Milieu nicht möglich ist. Mit der hinlänglich erörterten eigenen Methode der totalen Aktivierung und Freisetzung von strukturgebundenen Proteinen in eine klare wässrige Lösung können solche Testmethoden erstmalig auch auf die Frauenmilch Anwendung finden.

1. Die vergleichende Bestimmung der Milchsäuredehydrogenase-Aktivität in den drei Zustandsformen der Frauenmilch N, T und T3

Methodik

Herstellung der Chargenproben wie beschrieben.

Testverfahren entsprechend der Beilage zu den Reagenzien der Biochemica "Boehringer", Mannheim.

Die Milchsäuredehydrogenase, MDH, ist ein Ferment, welches beim intermediären Stoffwechselvorgang der Glykolyse, die aus dem Glukoseabbau re-

sultierende Milchsäure zur Brenztraubensäure (BTS) durch Wasserstoffentzug abbaut. Die BTS wird durch Dekarboxylierung zur aktivierten Essigsäure, die über das Coenzym-A Anschluß an den Zitronensäurezyklus gewinnt, wo sie zu Wasser und Kohlendioxyd abgebaut wird. Die MDH "katalysiert" folgenden reversiblen Vorgang:



(Brenztraubensäure plus Diphosphor-Pyridin-Nucleotid-Wasserstoff = Milchsäure plus Diphosphor-Pyridin-Nucleotid)

Von dem Ausgangs- bzw. Endprodukt der Reaktion ist keines optisch durch Lichtabsorption aktiv. Der optische Test beruht darauf, daß DPN-H, welches optisch aktiv ist, unmittelbar oder mittelbar an einer Reaktion beteiligt wird und quantitativ im gleichen molaren Verhältnis wie die Reaktionspartner umgesetzt wird zu DPN und dadurch seine optische Eigenschaft der Lichtabsorption verliert. Nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz ist die Konzentration an DPN-H direkt proportional der Lichtabsorption. Das Maximum der Absorption liegt bei Licht von der Wellenlänge 340 m μ . Die Messungen können aber auch bei 366 m μ durchgeführt werden, jedoch beträgt der Extinktionskoeffizient dann nur noch die Hälfte des Koeffizienten für Licht von der Wellenlänge 340 m μ . Das hat zur Folge, daß die Meßwerte um die Hälfte kleiner werden als bei Messungen bei 340 m μ . Die Messung bei 366 m μ ist von vornherein mit einem größeren Fehler behaftet, da die Meßempfindlichkeit nur halb so groß ist wie bei $\lambda = 340 \text{ m}\mu$. Das lichtabsorptiv wirksame DPN-H dient bei der MDH-Reaktion als Wasserstoffdonator bzw. -akzeptor und kann in seinen Veränderungen, die es durch die Reaktion erleidet, durch Messung direkt verfolgt werden. Der Gehalt an DPN-H in der Ansatzlösung ist Meßgröße.

Reagenzien:

0,05 m Phosphatpuffer (nach Sörensen: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) pH 7,6

$5 \cdot 10^{-3}$ m Na-Brenztraubensäure

$5 \cdot 10^{-3}$ m DPN-H (Cozymase I (69))

Sämtliche Reagenzien sind enthalten in "Biochemica-Test-Boehringer" zur Bestimmung der MDH-Aktivität. Auflösung der fertigen Ampullen zu gebrauchsfertigen Lösungen.

Der Bestimmungsansatz:

Ein Leerwert als Bezugswert ist nicht erforderlich. Er kann durch DPN-H-Zu-

satz so eingestellt werden, daß die Messung am Photometer in einem günstigen Skalenbereich erfolgen kann. Reaktionsgemisch und Prüflösung werden vor Gebrauch auf 25° C gebracht und nacheinander in eine 1 cm-Meßküvette pipettiert:

1,95 ml Puffer/Brenztraubensäure

0,05 ml DPN-H-Lösung

0,20 ml Prüflösung (2,5-fach verdünntes Milchserum)

Sofort nach Zugabe der Prüflösung wird eine Stoppuhr ausgelöst. Die Messung erfolgt abweichend von der Originalmethode in 2-min-Abständen bis zu 10 min. Gemessen wird der Extinktionsabfall ΔE bei Filter 366 m μ am Photometer Eppendorf.

Berechnung: Eine Enzymeinheit (MDH) nach BÜCHER ist die Enzymmenge, die bei 25° C die DPN-H-Extinktion bei 366 m μ in 100 sec um 0,100 (bezogen auf 1 ml und die 1-cm-Küvette) ändert, d.h. eine Enzymeinheit setzt in 100 sec 0,030 μ -Mol/ml oder 20,1 γ /ml DPN-H um. Folglich finden sich im 2,2 ml-Ansatz mit 0,2 ml-Probe für 1 min (60 sec)

$$\frac{\Delta E^{366}}{0,100} \cdot \frac{100}{60} \cdot \frac{2,2}{0,2} = E^{366}_{1 \text{ min}} \cdot 184 \text{ Einheiten/ml Probeflüssigkeit}$$

Da das Milchserum in 2,5-facher Verdünnung gewonnen wird, ist das Ergebnis zuzüglich mit 2,5 zu multiplizieren:

$$E/\text{ml} = \Delta E^{366}_{1 \text{ min}} \cdot 460$$

Die Abweichung in der Wahl des Zeitintervalls bei der Ausführung der Messung ist durch technische Umstände bedingt: Zur Verfügung steht ein Wasserbad und ein Eppendorf-Photometer, beide voneinander getrennt. Der Reaktionsansatz (Meßküvette) muß für die Dauer der Messung aus dem Wasserbad in das Photometer gebracht werden. Die Messung in 2-min-Abständen garantiert eine Temperaturkonstanz von 25°. Die Berechnung erfolgt aus dem Mittelwert der ersten 6 min. Zwecks Aufzeichnung der Reaktionsverläufe wird 10 min lang gemessen. Die Bestimmung aus jedem Chargenanteil erfolgt in Doppelproben. Über die doppelten Meßwerte wird gemittelt.

Ein Zahlenbeispiel:

Ein Zahlenbeispiel:

Charge 0, Probe Na und Nb

E (2 min)	ΔE (2 min)	ΔE (0-10 min)	ΔE (0-6 min)
0, 135			
123	0, 012	0, 073	<u>0, 045</u>
096		061	033
080	+ 016	044	016
065	<u>015</u>	028	
052	+ 013	013	
0, 110			
089	0, 021	0, 087	<u>0, 058</u>
069		066	037
052	+ 017	046	017
037	<u>015</u>	029	
023	+ 014	014	

Abb. 21

Mittelwerte:

ΔE (0-10 min)

(vgl. Abb. 21)

0, 080

0635

045

0285

0135

Der Extinktionsabfall in der 2. Rubrik wird von unten nach oben für die Dauer der gesamten Messung stufenweise zusammengezählt und ergibt die 3. Rubrik. Ebenfalls aus der 2. Rubrik wird der Extinktionsabfall während der ersten 6 min stufenweise zusammengezählt und ergibt die 4. Rubrik. Die Mittelwerte aus der 3. Rubrik ergeben die 5. Rubrik. Sie enthalten die Werte für die Aufzeichnung des Reaktionsverlaufes. Die Summen des Extinktionsabfalles während der ersten 6 min, unterstrichener Wert der 4. Rubrik, ergeben einen Mittelwert für das $\Delta E/\text{min}$ aus 6 min Reaktionszeit, wenn man den Mittelwert 0, 0515 durch 6 dividiert, von 0, 00858. Dieser Wert für den Extinktionsabfall/min wird mit dem Faktor 460 multipliziert. Als mittlere Aktivität aus zwei Proben des Chargenanteiles 0, N ergeben sich somit 3, 95 E/ml Milch. Die Er-Tab. 5 Ergebnisse sind im Zusammenhang in Tab. 5 wiedergegeben.

TABELLE 5

Chargen- anteile	M D H		Relative % von N	% Verlust (-) Zuwachs (+)		G O T		Relative % von N	% Verlust (-) Zuwachs (+)	
	E/ml			E/ml						
N	N	2,60	100	+ 0		22,7	100	+ 0		
	T	3,52	136	+ 36		23,6	104	+ 4		
	T3	1,68	65	- 35		16,1	71	- 29		
O	N	3,95	100	+ 0		28,8	100	+ 0		
	T	4,14	105	+ 5		24,6	85	- 15		
	T3	1,32	42	- 58		18,0	63	- 37		
P	N	4,33	100	+ 0		25,5	100	+ 0		
	T	3,91	90	- 10		24,1	95	- 5		
	T3	2,19	51	- 49		16,3	64	- 36		
Q	N	3,41	100	+ 0		18,9	100	+ 0		
	T	3,06	70	- 30		19,4	103	+ 3		
	T3	1,04	31	- 69		14,6	77	- 23		
R	N	3,76	100	+ 0		26,0	100	+ 0		
	T	4,18	111	+ 11		22,7	88	- 12		
	T3	3,45!	92	- 8		20,3	79	- 21		
Kochversuche:										
N	K 15":	-	-	-		3,8	16	- 84!		
K	K 30":					0,9	4	- 96!		

Kochversuche:

N K 15":	-	-	3,8	16	- 84!
K 30":	-	-	0,9	4	- 96!

Mittlere %-Sätze ohne Kochversuche:

N	-	100	+ 0	100	+ 0
T	-	102,4	+ 2,4	95	- 5
T3	-	56,2	- 43,8	70,8	- 29,2

2. Die vergleichende Bestimmung der Glutamat-Cxalacetat-Transaminase-Aktivität (GOT) in den drei Zustandsformen der Frauenmilch N, T und T3

Methodik

Herstellung von Chargenproben wie beschrieben.

Testverfahren entsprechend der Beilage zu den Reagenzien der Biochemica "Boehringer", Mannheim, zur Bestimmung der Serum-GOT-Aktivität.

Die GOT zählt zu den Aminopherasen (Transaminasen) und ist im Zellstoffwechsel von zentraler Bedeutung für den Zellstickstoffwechsel. Nach K. LANG (Vorlesungsaufzeichnung) ist die Glutaminsäure bzw. ihr stickstofffreies Antidot, die α -Ketoglutarinsäure, die "Eintrittspforte" für den ammoniakalischen Stickstoff in den intermediären Stoffwechsel der Zelle, wobei die Ketosäure durch Aufnahme von Ammoniak zur Iminosäure wird, die ihrerseits durch das Enzym Glutamindehydrogenase unter Wasserstoffzusatz zur Glutaminsäure reduziert wird (vgl. auch (70)). Nach diesem Vorgang tritt GOT in Aktion zwecks Weitergabe des Stickstoffs an andere Ketosäuren oder umgekehrt.

Die GOT "katalysiert" folgenden reversiblen Vorgang:

Glutaminsäure + Oxalessigsäure = Asparaginsäure + α -Ketoglutarinsäure (Formulierung des Umaminierungsvorganges s. (71)).

In den folgenden Versuchen ist der Reaktionsansatz so zusammengesetzt, daß die Reaktion von rechts nach links abläuft. Zur Katalyse werden dem Ferment lediglich Asparaginsäure und α -Ketoglutarinsäure angeboten, die zu Oxalessigsäure und Glutaminsäure umgebaut werden. Damit ist aber die Reaktion in einem optischen Test noch nicht erkennbar, weil keiner der Reaktionspartner und kein Reaktionsprodukt lichtabsorptiv wirksam ist. Es wird infolgedessen eine zweite, sogenannte Indikatorreaktion an die optisch nicht erfassbare Reaktion der Transaminierung gekoppelt: die erste Reaktion liefert Oxalessigsäure. Diese wird in der zweiten Reaktion unter Einwirkung von Äpfelsäuredehydrogenase bei Anwesenheit von DPN-H zu Äpfelsäure hydriert. Der DPN-H-Verbrauch im Reaktionsansatz ist der anfallenden Menge an Oxalessigsäure aus der ersten Reaktion direkt proportional. Meßgröße ist wiederum die DPN-H-Extinktion.

Reagenzien:

- | | |
|-----------------------|--|
| 0,1 m | Phosphatpuffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ nach SÖRENSEN) pH 7,4 |
| $4,2 \cdot 10^{-2}$ m | Asparaginsäure |
| 0,2 m | α -Ketoglutarinsäure-Natrium |
| $5 \cdot 10^{-3}$ m | DPN-H |
| 0,5 mg | Äpfelsäuredehydrogenase-Protein (AeDH) |

Sämtliche Reagenzien sind enthalten in den "Biochemica-Test-Boehringer" zur Bestimmung der Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Aktivität (SGOT-Aktivität). Auflösung der abgewogenen Fertigreagenzien zu gebrauchsfertigen Lösungen.

Der Bestimmungsansatz:

Zu jeder Bestimmung gehört ein Reagenzien-Leerwert:

Wasser statt Serum, ohne AeDH!

Es werden nacheinander in das Teströhrchen pipettiert:

2,30 ml Pufferlösung mit Asparaginsäure

0,05 ml DPN-H-Lösung

0,05 ml AeDH-Lösung

0,50 ml Prüflösung (Milchserum)

Durch Umschwenken wird gemischt und das Teströhrchen in ein thermo-konstantes Wasserbad von 25° C gebracht. Nach 15 min (s. Abweichungen von der Originalmethode!) werden

0,10 ml α -Ketoglutar säurelösung (KGS)

zupipettiert.

Die Reaktion läuft jetzt. Das gesamte Gemisch wird in eine 1 cm-Cuvette gegossen. Die Messung beginnt 1-2 min nach KGS-Zugabe und wird bis zu 10 min alle 2 min ausgeführt. Die Extinktion wird bei Licht von der Wellenlänge 366 m gegen den Leerwert abgelesen.

Es gilt für die Wahl 366 oder 340 m μ Wellenlänge das bei der MDH-Reaktion bereits Gesagte. Das gemessene ΔE soll nicht größer sein als 0,300/2 min.

Spuren von Transaminase im AeDH-Präparat bestimmt man einmal für jedes AeDH-Präparat. Hierbei ist Wasser statt Serum einzusetzen und gegen eine Cuvette mit Wasser zu messen.

Berechnung: Nach der Definition von LA DUE, WROBLEWSKI und KARMEN ist eine Einheit die Transaminasemenge in 1 ml Prüflösung, die bei 25° im 3 ml-Ansatz die DPN-H-Extinktion bei 340 m μ in einer Minute um 0,001 ändert:

$$\Delta E_{1 \text{ min}}^{340} \cdot 1000 \cdot 2 = \Delta E_{1 \text{ min}}^{340} \cdot 2000 = \text{GOT-Einheiten}$$

in der Prüflösung. Für die bei 366 m μ erfolgte Messung ist zur Berechnung der entsprechenden Einheiten gemäß dem Verhältnis der Extinktionskoeffizienten mit 1,98 zu multiplizieren: $2000 \cdot 1,98 = 3780$. $\Delta E_{1 \text{ min}}^{366} \cdot 3780 = \text{GOT-Einheiten}$. Die Berechnung der GOT-Einheiten aus dem 2,5-fach verdünnten Milchserum:

$$\Delta E_{1 \text{ min}}^{366} \cdot 3780 \cdot 2,5 = E/\text{ml Milch}$$

$$\frac{\Delta E_{1 \text{ min}}^{366}}{\cdot 9450} = \text{E/ml Milch}$$

Abweichungen von der Originalmethode

Grundsätzlich wird am Bestimmungsansatz nichts geändert. Bei den ersten Untersuchungen zeigte sich sehr bald, daß die GOT-Reaktion von einer oder mehreren anderen Reaktionen überlagert wird (vgl hierzu "Allgemeines zur Ausführung enzymatischer Testmethoden" der "Biochemica-Test-Boehringer"-Gebrauchsanweisung). Ohne Zusatz des für die Transaminase spezifischen Substrates KGS kommt es über Stunden zu einem ständigen DPN-H-Verbrauch. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, diese Reaktion vor Substratzusatz bis zur völligen Konstanz der Extinktion abklingen zu lassen. Meistens handelt es sich bei dieser Überlagerungsreaktion um die MDH-Reaktion. Da die MDH in der Milch nachgewiesen ist, nimmt ein solcher vorab erfolgreicher DPN-H-Abbau nicht wunder. Er setzt allerdings voraus, daß in der Milch auch das zugehörige Substrat, die Brenztraubensäure, von vornherein vorhanden sein muß. Diese langwierigen Vorinkubationen sind ein erstes Hindernis für die unveränderte Anwendung des Testverfahrens auf das Milchserum. Es ist keineswegs sicher, daß nicht noch andere Dehydrogenasen und entsprechende Substrate in der Milch vorhanden sind, die alle DPN-H als Wasserstoffdonator verbrauchen, ehe mit der spezifischen Aktivitätsbestimmung für KGS begonnen werden kann. Alle diese Vorgänge müssen in Summe abgeklungen sein, bevor die Bestimmung der spezifischen GOT-Aktivität beginnen kann. Daraus ergibt sich die

1. Abweichung von der beschriebenen Originalmethode.

Wie der Chargenanteil N, T in seinem Verlauf zeigt, sind die überlagerten Vorgänge nach 60 min noch nicht abgeklungen. Eine Reihe von Messungen zeigte nach durchschnittlich 18-20 Std, einen Stillstand der Vorreaktionen. Zwischen der Fertigstellung des Reaktionsansatzes bis zur Zugabe von KGS, dem Substrat für den Start der GOT-Reaktion, vergeht also ein wesentlich längerer Zeitraum als in der Originalmethode für Blutserum angegeben ist (15 min). Die Teströhrchen werden mit den Reagenzien beschickt, ausgenommen KGS, und für 24 Std, ins Wasserbad gebracht. Die Vorreaktionen haben damit genügend Zeit, zum Stillstand zu kommen. Bei diesem Verfahren ist es notwendig, die Ansatzröhrchen (wie bei der Phosphatasereaktion bereits beschrieben) luftdicht abzuschließen, damit für die lange Vorinkubationszeit ein nicht unerheblicher Fehler durch Verdunstung sicher vermieden wird. Die Erklärung für das zeitraubende Verhalten der Vorreaktion liegt auf der Hand: Ferment und Substratgehalt für die Vorreaktion sind in geringer Menge

Abb. 22

im Ansatz vorhanden. Folglich dauert es lange, bis zwischen allen Reaktionsteilnehmern ein chemisches Gleichgewicht hergestellt ist. Mit 24 Std. ist ein für die Genauigkeit genügend exaktes Intervall bis zur Zugabe des spezifischen Substrates KGS (Reaktionsstart) gewählt.

Der Reagenzienleerwert in der angegebenen Form erweist sich bei der Prüfung des Milchserums als unbrauchbar. Zu Beginn der Reaktion liegt die Extinktion des Reaktionsansatzes höher als der Leerwert. Nach Ablauf der Vorreaktion ist der DPN-H-Verbrauch soweit fortgeschritten, daß die Extinktion des Reaktionsansatzes weit unter die des unverändert gebliebenen Leerwertes abgesunken ist, so daß die eigentliche Reaktion nur noch im negativen Meßbereich abgelesen werden könnte. Eine solche Messung am Eppendorf-Gerät ist aber unmöglich. Daraus ergibt sich die

2. Abweichung vom Originalverfahren.

Der Leerwert wird mit DPN-H für eine Serie von Versuchen so eingestellt, daß eine Ablesung der Extinktionsänderung in einem günstigen Bereich der logarithmischen Skala erfolgen kann. Dieses Verfahren ist insofern berechtigt, als für das DPN-H, genauso wenig wie in der Originalmethode, keine Absolutwerte von DPN-H, sondern lediglich die Extinktionsänderung von einem variablen Fixwert aus bestimmt werden. Fixwerte in verschiedenen Meßbereichen sind, wie mehrere Versuche gezeigt haben, ohne jeden Einfluß auf die Größe des Extinktionsabfalls ΔE . Ein einfaches Zahlenbeispiel mag diese Aussage erläutern:

Zeit in min	Fixwert I	ΔE	Fixwert II
0	0,200	0,010	0,560
2	190	010	550
4	180	010	540
6	170	010	530

Praktisch ist es aber dennoch wichtig, wo der Fixwert (Ausgangswert), der von der Zusammensetzung des Leerwertes abhängt, auf der Skala abgelesen wird. Hohe Zahlenwerte können auf der Skala nicht genau bestimmt werden; tiefe Zahlenwerte lassen sich auf 3 Stellen hinter dem Komma genau ablesen. Im Interesse der Genauigkeit wurde der Leerwert so eingestellt, daß die Ablesung in einem relativ niedrigen Skalenbereich erfolgen konnte.

Alle übrigen methodischen Bedingungen wurden exakt eingehalten. Die Aus-

wertung der Zahlen, die durch Messung gefunden worden sind, erfolgte ähnlich der bei der MDH angewandten Methode.

Ein Zahlenbeispiel:

Charge N, Probe Na und Nb

E (2 min)	ΔE (2 min)	ΔE (0-10 min)	
0,330			
324	0,006	0,026	
319	005	020	
315	004	015	
310	005	011	
304	+ 006	006	Mittelwerte
			ΔE (0-10 min)
0,336			0,0265
331	0,005	0,027	021
325	006	022	0155
320	005	016	011
314	006	011	0055
309	+ 005	005	

Der Extinktionsabfall in der 2. Rubrik wird von unten nach oben für die Dauer der gesamten Messung (10 min) zusammengezählt und ergibt die 3. Rubrik. Die Mittelwerte der 3. Rubrik ergeben die 4. Diese enthält die Werte für die Aufzeichnung des Reaktionsverlaufes. Die Summen des Extinktionsabfalles, unterstrichene Werte der 3. Rubrik, ergeben einen Mittelwert für $\Delta E/\text{min}$ aus 10 min Reaktionszeit, wenn man den Mittelwert (4. Rubrik) 0,0265 durch 10 dividiert = 0,00265. Von diesem Mittelwert muß der Blindwert pro Minute (Verunreinigung durch das AeDH-Präparat), der ebenfalls durch Messung über 10 min ermittelt wird, subtrahiert werden.

$$\begin{aligned}
 \Delta E/\text{min} &= 0,00265 \\
 - \Delta E (\text{Bl})/\text{min} &= 0,00025 \\
 \hline
 \text{wirkliches } \Delta E/\text{min} &= 0,00240
 \end{aligned}$$

Die Multiplikation dieses $\Delta E/\text{min}$ mit dem Faktor 9450 ergibt

$$22,7 \Delta E/\text{ml Milch}$$

Die Ergebnisse sind im Zusammenhang in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tab. 5

3. Diskussion der Ergebnisse

Die Methodik der "Biochemica-Test-Boehringer" wurde mit nur geringen methodischen Änderungen übernommen, ohne die eine exakte Untersuchung nicht möglich ist. Bezogen auf die Nativmilch liegt die durchschnittliche Aktivität für die gefriergetrocknete Milch aus 5 Chargenversuchen bei der MDH um 2,4% höher als in der Nativmilch. Beim trockenen Erhitzen fällt der durchschnittliche Prozentsatz auf 56,2. Die entsprechenden Werte für Verluste oder Zuwachs an Aktivität sind im Durchschnitt für T = + 2,4% und für T3 = - 43,8% von der Aktivität in der Nativmilch. Die Werte haben eine Schwankungsbreite von + 36 bis - 30% bei T gegenüber N und von - 8 bis - 69% bei T3 gegenüber N.

Bei der GOT liegt die durchschnittliche Aktivität aus 5 Chargenversuchen für die gefriergetrocknete Milch um 5% niedriger als in der Nativmilch. Durch trockenes Erhitzen sinkt der durchschnittliche Prozentsatz auf 70,8. Die entsprechenden Werte für Verluste an Aktivität sind im Durchschnitt für T = - 5 und für T3 = - 29,2% von der Aktivität in der Nativmilch. Die Werte haben eine Schwankungsbreite von + 4 bis - 15% bei T gegenüber N und von - 21 bis - 37% bei T3 gegenüber N.

Da die Aktivität in den Milchserumproben außerordentlich gering ist im Vergleich zu den Aktivitäten im Blutserum, so machen sich kleine Fehler im Gesamtergebnis prozentual sehr stark bemerkbar. Die Schwankungsbreite der Methode ist somit für die Bestimmung im Blutserum, wo mit dem 100-Fachen an Aktivität gerechnet wird, sehr viel zuverlässiger als bei der Bestimmung im Milchserum. Bei Untersuchungen mit Milchserum kann die Schwankungsbreite der Einzelbestimmung so erheblich sein, daß Überschneidungen mit einer Einzelbestimmung eines anderen Chargenanteils durchaus möglich sind. Die Entscheidung darüber, wo der Fehler liegt, ist außerordentlich schwierig. Die erste Möglichkeit liegt natürlich wieder in der möglichen Unvollständigkeit des Verfahrens zur totalen Aktivierung. Sodann ist die Möglichkeit von Pipettierfehlern bei der Bereitung des Bestimmungsansatzes reichlich gegeben. Die Messung des Reaktionsverlaufs im Eppendorf-Gerät ist jedoch außerordentlich exakt, wie man sich aus der mathematischen Erfassung des Reaktionsablaufs bei dem Chargenanteil N, T überzeugen kann. Zudem können Temperaturschwankungen von 1° C Fehler von + 10% verursachen.

Betrachtet man die durchschnittlichen Prozentsätze, so ergeben sich ähnliche Folgerungen, wie sie bei Betrachtung der entsprechenden Ergebnisse der Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität zu erheben waren. Auch

diese Zellfermente sind strukturegebunden. Wären sie es nicht, so wären einem geordneten Stoffwechsel innerhalb einer Milchdrüsenzelle alle Voraussetzungen entzogen. Die Aktivierung stößt vielleicht auf noch größere Schwierigkeiten, als dies bei der Phosphataseaktivierung der Fall war, weil möglicherweise die Strukturbindung stärker ist als die der Phosphatase. Den Beweis erbringen Versuche mit Magermilch, die durch Zentrifugieren und Filtrieren gewonnen und anschließend dem Aktivierungsverfahren unterworfen wurde. Eine Aktivität ist nicht mehr nachweisbar. Sie ist vollständig in die Fett-Lipoidfraktion übergegangen. Bei der alkalischen Phosphatase liegen die Verhältnisse wesentlich zugunsten der Magermilch.

Die Empfindlichkeit der untersuchten Fermente gegenüber trockenem Erhitzen (3 Std. bei 100° C) ist beachtlicherweise unterschiedlich. Am empfindlichsten erweist sich die MDH. Weniger empfindlich ist die GOT, während die alkalische Phosphatase die größte Stabilität gegenüber trockenem Erhitzen zeigt. Feuchtes Erhitzen von kürzester Dauer läßt bei Phosphatase und MDH jegliche Aktivität vermissen, dagegen bleibt für die GOT eine geringe Rest-Aktivität, die nach 5-minütigem Kochen restlos verschwindet.

4. Die mathematische Erfassung eines Reaktionsverlaufs zur Bestimmung des Endpunktes der Vorreaktionen (Startpunkt der GOT-Reaktion)

Vorreaktion zum GOT-Versuch der Charge N, T:

Zeit (min):	0	2	4	6	8	10	12
Meßwerte :	0,500	,465	,446	,434	,426	,419	,412
	14	16	18	20	22	24	26
	0,407	,402	,397	,394	,390	,386	,382
	30	34	40	50	60		
	0,376	,371	,363	,351	,342		

Abb.22

Trägt man diese Zahlenwerte in einer Graphik gegen die Zeit auf, so ergibt sich daraus eine Verlaufskurve für die angenommenen Vorreaktionen, die sich als abklingender Vorgang manifestiert. In erster Näherung ist im Falle der Vorreaktionen mit einer chemischen Reaktion zu rechnen. Handelt es sich tatsächlich um eine einzige Reaktion, die für den der eigentlichen GOT-Reaktion vorausgehenden DPN-H-Verbrauch verantwortlich ist, so muß der Ablauf dem Gesetz von GULDBERG und WAAGE (72) entsprechen.

Das Gesetz lautet in allgemeiner Formulierung:

$$x = a(1 - e^{-kt}),$$

wobei x die Meßgröße, a die bekannte Anfangskonzentration des umgesetzten Stoffes, e die natürliche Zahl, k eine Reaktionskonstante und t die Zeit darstellen.

Setzt man für x die Extinktion E'' in die Gleichung ein, die ein direktes Maß für den Gehalt an DPN-H in der Lösung ist (Bestimmungsansatz), so erhält man für E eine vom Nullpunkt ausgehende ansteigende Kurve, die sich allmählich einem Endwert nähert, der mit dem Reaktionsgleichgewicht identisch ist.

Abb.23
$$E'' = a(1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

Multipliziert man den Ausdruck für E mit -1 , so sind die Werte für E spiegelbildlich zu den vorhergehenden um die t -Achse gelegen.

$$\begin{aligned} E'' &= -a(1 - e^{-kt}) \text{ aufgelöst:} \\ E'' &= -a + a \cdot e^{-kt} \end{aligned} \quad (2)$$

Auch diese Kurve beginnt im Nullpunkt, denn für $t = 0$ ist $E = -a + a = 0$. Sie verläuft spiegelbildlich zu der Gleichung (1), wobei die t -Achse die Symmetriegerade darstellt. Damit ist eine direkte Umkehr des Gesetzes von GULDBERG und WAAGE gefunden. Die errechenbaren Werte liegen aber im Negativen. Sie entspricht lediglich in ihrem Abfall dem Massenwirkungsgesetz. Negative Meßwerte gibt es indes nicht.

Addiert man zu dem Ausdruck für E den Wert a in Gleichung (2), so wird dadurch die Kurve um a auf der Ordinate für jeden Punkt gehoben. Die Kurve liegt jetzt ganz im positiven Bereich.

$$E' = a \cdot e^{-kt} \quad (3)$$

Für $t = 0$ ergibt sich der entsprechende Wert für $E = a$. Läßt man t gegen ∞ gehen, so nähert sich E asymptotisch dem Wert 0. Damit ist aber noch immer kein Schema gefunden, welches den Anforderungen genügt, denn die Reaktion bleibt nicht auf einem Endwert 0, sondern auf einem bestimmten positiven Endwert E_0 stehen (Reaktionsgleichgewicht). Addiert man auch noch diesen Wert E_0 zu dem Ausdruck für E , so hebt man die Kurve um einen weiteren Betrag für E , nämlich um E_0 .

$$E = a \cdot e^{-kt} + E_0 \quad (4)$$

Für $t = 0$ ergibt sich für E ein entsprechender Wert $E = a + E_0$. Läßt man t gegen unendlich gehen, so nähert sich E asymptotisch dem Wert E_0 .

Mit dieser letzten Manipulation ist die theoretisch richtige Formulierung zur Determinierung einer chemischen Reaktion mit erfaßbaren abklingenden Meßwerten gefunden. Die Formulierung entspricht genau dem Gesetz von GULDBERG und WAAGE. Sie ist direkt auf den Reaktionsablauf im optischen Test anwendbar.

E ist die Extinktion, die gesucht wird, a eine Konstante, e die natürliche Zahl, k die Reaktionskonstante und E_0 der Endpunkt der Reaktion (chemisches Gleichgewicht).

Versucht man durch Einsetzen von Wertepaaren in die Gleichung (4), durch Substitution der Werte E und t durch entsprechende Werte aus der Meßwerttabelle zwecks Ermittlung der Konstanten a , E_0 und k , so stellt man immer wieder fest, daß zwar die Formulierung der Gleichung mit Zahlenwerten für die Konstanten gelingt, daß aber die theoretische Kurve mit der Meßwertkurve lediglich in den drei Punkten übereinstimmt, aus denen die theoretische Kurve gewonnen worden ist. In allen anderen Abschnitten sind konvergierende und divergierende Abweichungen von den Meßwerten festzustellen. Damit kann klar herausgestellt werden, daß die Meßwertkurve nicht entsprechend dem Massenwirkungsgesetz verläuft. Demgegenüber ist eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit dem theoretischen Gesetz und den Meßwerten beim Studium eines Reaktionsverlaufes nach Ablauf der Vorreaktion bei der GOT-Reaktion festzustellen. Somit kann die Vermutung auch theoretisch untermauert werden, daß bei der Vorreaktion nicht nur ein Ferment an dem Umsatz von DPN-H beteiligt ist, sondern zwei oder mehrere. Daraus ergäbe sich für E die allgemeine Formulierung:

$$E = a_1 \cdot e^{-k_1 t} + E_{01} + a_m \cdot e^{-k_m t} + E_{0m} + \dots$$

wobei alle Reaktionsteilnehmer sich in die Anfangskonzentration teilen. Daß solche "Summen" nicht mehr der ursprünglichen Gesetzmäßigkeit gehorchen, ist ohne weiteres einzusehen. Jeder einzelne Anteil gehorcht zwar dem Massenwirkungsgesetz, in Summe ergibt sich aber ein anderer Verlauf, der dem Massenwirkungsgesetzähnlich ist.

In einer Reihe von Versuchen, den theoretischen Rechenansatz so zu ändern, daß seine zahlenmäßige Formulierung dem gefundenen Ablauf der Vorreaktion entspricht, hat sich durch zufälliges Einsetzen der Wurzel aus der Zeit (Änderung des Exponenten) eine exakte Übereinstimmung der theoretischen Kurve mit der Meßwertkurve ergeben. Dementsprechend lautet die Kurvengleichung:

$$E = a \cdot e^{-k\sqrt{t}} + E_0 \quad (5)$$

Für die Berechnung empfiehlt es sich, den Ausdruck $e^{-k\sqrt{t}}$ durch die Basis 10 mit dem entsprechenden Exponenten $-k, \sqrt{t}$ zu ersetzen.

Nach der Formel für die Umwandlung von natürlichen Logarithmen in dekadische: $\ln N = \ln 10 \cdot \log N$

läßt sich der entsprechende dekadische $\log k$, errechnen:

$$k, = \frac{k}{\ln 10}$$

Dementsprechend lautet die Gleichung (5) mit der Basis 10 für den Exponentialausdruck

$$E = a \cdot 10^{-k, \sqrt{t}} + E_0 \quad (6)$$

Die algebraische Bestimmung der Konstanten a , k , E_0 durch Aufstellung von drei Gleichungen aus drei Wertepaaren:

(1)	$E = 500; \quad t = 0$	--	$500 = a \cdot \frac{1}{1} + E_0$	
(2)	$E = 423; \quad t = 9$	--	$423 = a \cdot \frac{1}{10^{k \cdot 3}} + E_0$	423 und 368 sind interpolierte Meßwerte, da bei 9 u. 36 min nicht gemessen wurde.
(3)	$E = 368; \quad t = 36$	--	$368 = a \cdot \frac{1}{10^{k \cdot 6}}$	

Aus diesen Gleichungen mit drei Unbekannten errechnet sich k wie folgt:

Subtraktion (1) - (2) und (2) - (3) führt zur Eliminierung von E_0 .

Division $\frac{(1) - (2)}{(2) - (3)}$ führt weiter zur Eliminierung von a .

Durch Auflösung des restlichen Ausdrucks und Entlogarithmieren ergibt sich für k

$$k = 0,04871$$

Bestimmung von a aus der Gleichung (1) - (2) nach Einsetzen von k :

$$a = 269,5$$

Bestimmung von E_0 aus der Gleichung (1)

$$E_0 = 230,5$$

Demnach lautet die gesuchte Funktion E von der Zeit in Zahlen ausgedrückt:

$$E = 269,5 \cdot 10^{-0,04871\sqrt{t}} + 230,5$$

Als natürliche Funktion ausgedrückt:

$$E = 269,5 \cdot e^{-0,11214\sqrt{t}} + 230,5$$

Die zweite Formel ist für Berechnungen sehr umständlich, weil das Rechnen mit natürlichen Logarithmen schwieriger ist als das mit dekadischen.

Bei der Errechnung der Unbekannten aus drei Wertepaaren ist es nicht ganz gleichgültig, welche Zeitwerte man wählt. Die Wahl von $t = 0$ hat sich als sehr günstig erwiesen, weil damit die Rechnung erheblich vereinfacht wird und ein errechneter Wert mit einem Meßwert genau übereinstimmt. Die Wurzel aus der Zeit im dritten Wertepaar muß das Doppelte von der aus dem zweiten Wertepaar betragen, sonst ist die Berechnung der Konstanten k algebraisch nicht mehr möglich. (Das gleiche gilt übrigens für die Umformulierung des GULDBERG-WAAGE'schen Gesetzes für die einfache Zeit.) Die Wahl der Wertepaare muß nur diese Bedingung erfüllen.

Ergebnis:

Zeit in min	Extinktion		Differenz
	gemessen	berechnet	
0	0,500	0,5000	0,0000
2	465	4605	- 0057
4	446	4458	- 0002
6	434	4353	+ 0013
8	426	4267	+ 0007
10	419	4195	+ 0005
12	412	4132	+ 0012
14	407	4076	+ 0006
16	402	4026	+ 0006
18	397	3980	+ 0010
20	394	3937	- 0003
22	390	3898	- 0002
24	386	3861	+ 0001
26	382	3826	+ 0006
30	376	3763	+ 0003
34	371	3706	- 0004
40	363	3631	+ 0001
50	351	3521	+ 0014
60	342	3435	+ 0015

Die mittlere Abweichung beträgt 0,00086, das ist in % von E_0 2% Streubreite, die sich um die errechneten Werte mit $\pm 1\%$ verteilt. Diese Verteilung ist wichtig für den theoretischen Endwert E_0 . Theoretisch wird der Endwert erst im Unendlichen erreicht, weil sich E mit unendlicher Zeit asymptotisch dem Wert E_0 nähert. In Wirklichkeit wird aber ein Reaktionsgleichgewicht erreicht nach endlicher Zeit. Die Streuung um den Endwert beträgt $\pm 1\%$. 1% von E_0 0,2305 ist 0,002305, die Streubreite 0,0046.

Durch eine Bestimmungsungleichung für die Zeit t_0 , nach welcher die theoretische Kurve in das Streuungsband eintaucht, muß der Ausdruck

$$a \cdot 10^{-k\sqrt{t}}$$

gerade so groß oder kleiner sein als 0,0046

$$\frac{0,2695}{10^{0,04871\sqrt{t_0}}} \leq 0,0046$$

Durch Entlogarithmieren und Quadrieren der Ungleichung ergibt sich für das gesuchte $t_0 = 1081,5$ min.

Das heißt: nach frühestens 18 Std. (1 min, 30 sec) ist die Vorreaktion zum Stillstand gekommen.

Die Berechnung hat 1. eine für den optischen Test gültige Umformung des Massenwirkungsgesetzes und 2. eine mathematische Bestimmung des Endpunktes der Vorreaktion zum Start der GOT-Reaktion ermöglicht. Die Vorreaktion kann in ihrem Verlauf nicht nach dem Massenwirkungsgesetz formuliert werden. In diesem Zusammenhang sei die Bemerkung erlaubt, daß der Exponent im Massenwirkungsgesetz sich bei gleicher Beteiligung mehrerer Fermente am Umsatz eines Stoffes möglicherweise so ändert, daß die Zahl der sich überschneidenden Reaktionen als Exponent der Wurzel aus der Zeit in die Formel eingeht. In unserem Falle wären es zwei Reaktionen, die sich überschneiden. Diese Annahme ist jedoch durch nichts bewiesen. Sie könnte nur experimentell geklärt werden.

IV. Bakteriologische Tests

1. Orientierende Untersuchungen

Nachdem in den vorangehenden Kapiteln die Thermostabilität gefriergetrockneter Milchproteine gegenüber 100° C über mehrere Stunden bewiesen worden ist und eine eindeutige obere Toleranzgrenze bei dieser Temperatur nicht nachgewiesen werden konnte, soll in den folgenden orientierenden Untersuchungen geprüft werden, ob die bekannte Thermostabilität gefriergetrockneter Bakterien eine Toleranzgrenze besitzt, die noch innerhalb des Grenzbereichs für die Thermostabilität der Proteine gelegen ist. Nur wenn die Bakterien im Trockengut eine geringere Temperaturreistenz aufweisen als die Proteine, so wird mit dem trockenen Erhitzen von Frauenmilch infolge zusätzlicher Keimreduktion ein zusätzlicher Konservierungseffekt erreicht.

Die bakteriologischen Untersuchungen wurden im Hygienischen Institut der Universität Mainz durchgeführt, wofür an dieser Stelle mein herzlichster Dank ausgesprochen sei.

1. Versuch:

Bakteriologische Daten der untersuchten Ausgangsmilch (Zählung im Plattenverfahren nach DEMETER (73)):

ca. 500 000 Keime/ml: Staphylokokkus albus
 Enterokokken
 Bakterien der Coligruppe

5 Proben dieser Milch wurden zu 20 ml gefriergetrocknet. Vier Proben wurden anschließend einer trockenen Erhitzung bei 100° C für folgende Zeiten ausgesetzt: II: 30 min, III: 1 h, IV: 1 h 30 min, V: 2 h. Die Probe I blieb unbelastet. Alle Proben wurden mit sterilem Aq. bidest. bei 37° C wiederaufgelöst, im sterilen Meßkolben auf das Ausgangsvolumen gebracht und von jeder Probe eine 0,1 ml-Probe auf je einer Blutagar- und einer Pepton-Fuchsin-Laktose-Agar-Platte ausgespatelt. Bebrütung über 24 h und Aufbewahrung im Dunkeln über 48 Std. Versuch der direkten Zählung ohne Verdünnungsreihe.

Ergebnis:

	Blutplatten Bemerkungen	Keime/ml
Nativmilch:	dichter Rasen	500 000 (Plattenverf.)
gefr. -getr. Milch:	Dezimierung	unzählbar
Erhitzte Tr. Milch 30 min:	starke Dezimierung	"
1 h 0 min:	" "	"
1 h 30 min:	kaum zählbar	ca. 11 000
2 h 0 min:	zählbar	1 800

Laktoseplatten (Mac CONKEY (74))

Nativmilch:	nicht zählbar	-
gefr. -getr. Milch:	kaum zählbar	ca. 9 000
Erhitzte Tr. Milch 30 min:	kein Wachstum	-
1 h 0 min:	" "	-
1 h 30 min:	" "	-
2 h 0 min:	" "	-

2. Versuch:

Bakteriologische Daten der untersuchten Milch:

ca. 3 000 000 Keime/ml: Bakterien der Coligruppe
Bakterien der Alkaligenes - Gruppe
Staphylokokkus albus

25 Proben dieser Milch wurden zu 20 ml gefriergetrocknet. Einteilung in 4 Gruppen zu je 5 Flaschen. Von jeder Gruppe bleibt je eine Trockenprobe unbelastet. Trockenes Erhitzen von 4 Proben auf Zeiten, wie in der folgenden Tabelle angegeben. 5 Proben werden für eine halbe Stunde bei 100° C erhitzt und nach Wiederauflösen wie im 1. Versuch auf je einer Laktose-Agar-Platte ausgespatelt. In gleicher Weise wird auch mit je einer Probe unbelasteter Trockenmilch verfahren. Alle anderen Proben kommen auf Blutagar-Platten (aus finanziellen Gründen steht meist nur eine halbe Platte für eine Probe zur Verfügung!). Bebrütung und Lagerung bei Dunkelheit wie im 1. Versuch. Untersuchung der Gruppen nach Gefrietrocknung nach 0, 4, 8, 12, 16 und 20 Tagen. Die Erhitzung der einzelnen Gruppen erfolgte an den Untersuchungstagen. Bebrütung der 0,1 ml-Proben unmittelbar nach dem Erhitzen.

Ergebnis:

Keime/ml in direkter Zählung; Belastung bei 100° C

Alter des Trocken-		unbelastet	belastet			
materials in Tagen			1h-30'	2h-0'	3h-0'	4h-0'
VII	0	dichter Rasen unzählbar	2960	930	70	50 (Abb. 24a. c)
VIII	4	"	590	540	110	40
IX	8	"	200	20	40	110
X	12	"	60	60	50	30
XI	16	"	-	90	30	10
XII	20	"	-	40	50	-

(-) bedeutet: die Proben fallen aus wegen Verunreinigungen durch Luftkeime und wegen Verlaufsens auf der Platte.

Die 5 Laktose-Agarplatten mit Proben von 1/2-stündig belasteter Milch zeigen sämtlich kein Wachstum! Die entsprechenden Proben mit unbelasteter Trockenmilch lassen nach 4 Tagen Lagerung kaum noch Bakterien der Coligruppe erkennen (gramnegative Stäbchen im Ausstrichpräparat), nach 8 Tagen ist kein Wachstum mehr erkennbar. Die Empfindlichkeit der Keime auf den Blutplatten nimmt mit zunehmender Lagerungszeit gegen trockenes Erhitzen kontinuierlich zu. Die Erhitzung bringt nach 2 Stunden eine Keimreduktion mit sich, die unabhängig von der Dauer der Lagerung praktisch keinen signifikanten Unterschied zwischen frischer und trocken gelagerter Milch mehr erkennen läßt. In jedem Falle hat aber die Erhitzung eine so starke Keimreduktion verursacht, wie sie durch die Lagerung nach Gefriertrocknung nicht einmal erreicht werden konnte. Im günstigsten Falle ist nach 1 h 30' eine Überlebensrate von nur noch rund 0,1 bis 0,2% erreicht. Nach 3 h beträgt die Überlebensrate bei frischer Milch 0,003%. Dieser Prozentsatz an überlebenden Keimen ändert sich mit zunehmender Belastung nur mehr unwesentlich. In allen Fällen ist bei einer Dreistunden-Belastung ein Minimum erreicht. Dieses Minimum wird nach Lagerung bereits durch eine Belastung von 1 1/2 Stunden erreicht.

3. Versuch: (Chargen H, J und K)

(Mit diesen Chargen wurden sowohl elektrophoretische Versuche als auch Aktivitätsbestimmungen für die alkalische Phosphatase vorgenommen.)

Nachdem im 2. Versuch eine maximale Keimreduktion durch eine 3-stündige Belastung festgestellt werden konnte, werden in diesem Versuch nur noch 3-Stunden-Belastungen durchgeführt und die belasteten Milchproben mit unbelasteten und Nativmilchproben verglichen. Eine vorausgehende Keimbestimmung in der Nativmilch war nicht möglich. Verfahren wie in den vorherigen Versuchen. Die gleichen Platten wurden 8 Tage nach der ersten Zählung weiter aufbewahrt und erneut ausgezählt. Bebrütung nur auf Blutagar.

Chargen		Chargenanteile		
		Keime/ml in direkter Zählung		
		N	T	T 3
Abb.25 a-c	I sofort gezählt			
	H:	unzählbar	980	30
		unzählbar viele Sporenbildner		
	J:	unzählbar	unzählbar	4100
	K:	unzählbar	2800	180
II nach 8 Tagen erneut gezählt				
	H:	unzählbar	1370	110
		unzählbar viele Sporenbildner		
	J:	unzählbar	unzählbar	ca. 15 000
	K:	unzählbar	3270	370

Im Ausstrichpräparat fanden sich in der Charge

H: Staphylokokken, gramnegative Stäbchen und Sporenbildner

J: Staphylokokken

K: Staphylokokken und Streptokokken

Unmittelbar nach der Bebrütung und Lagerung über insgesamt 62 Std. fand die erste Keimzählung statt (I. Teil der Tabelle). Die zweite erfolgte 8 Tage nach der ersten Zählung (II. Teil der Tabelle).

Aus diesem Versuch geht hervor, daß es sich bei dem Phänomen der Keimreduktion durch trockenes Erhitzen nicht nur um eine Keimvernichtung handelt, sondern z. T. auch um einen Effekt der Wachstumshemmung. Keimkolonien, die unmittelbar nach der Bebrütung noch nicht sichtbar waren, wurden nach 8 Tagen zusätzlicher Lagerung der Platten (nicht der Trockenproben!) als kleine Kolonien sichtbar und zählbar.

In der Charge H waren die Kokken bereits durch die Gefriertrocknung allein erheblich dezimiert; die Zunahme nach Lagerung im Dunkeln war hier wie auch nach trockenem Erhitzen nicht erheblich. Dagegen waren die Sporenbildnerkolonien in allen Proben, auch in denen nach trockenem Erhitzen, außerordentlich zahlreich. Gramnegative Stäbchen ließen sich in Ausstrichpräparaten nach Erhitzen nicht mehr finden.

Die stärkste Zunahme auf den gleichen Platten konnte in der sehr keimhaltigen Charge J festgestellt werden. Nach 8 Tagen war eine Keimkolonievermehrung um das 3-Fache eingetreten.

Ähnlich wie bei den Kokken und Stäbchen der Charge H verhält es sich mit den Kokkenkolonien der Charge K.

Die zusätzliche Senkung der Überlebensrate von der Stufe der Gefriertrocknung zum trockenen Erhitzen beträgt 90 - 97% der Kolonien, die nach Gefriertrocknung zählbar waren.

2. Diskussion

Die vorangehenden Untersuchungen erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Sie sollten lediglich zur Orientierung über das notwendige Ausmaß der Hitzebelastung dienen, die für eine ausreichende Keimreduktion erforderlich ist. Eine Ausdehnung der Untersuchungen auf die anstehenden, durch die Versuche aufgeworfenen Probleme konnte wegen finanzieller Schwierigkeiten nicht erfolgen.

Zusammenfassend läßt sich den vorangehenden Untersuchungen entnehmen:

1. daß eine Keimreduktion, die sichtbar und teilweise auch zahlenmäßig erfaßbar war, in jeder Milchprobe und für jede Keimart, auch für die Sporenbildner festgestellt werden konnte, die das Maß der Keimreduktion durch die Gefriertrocknung allein weit überschreitet.
2. daß der Entkeimungseffekt durch trockenes Erhitzen und durch Gefriertrocknung sehr unterschiedlich ist je nach Keimart und Milch. Am empfindlichsten erweisen sich die gramnegativen, laktosevergärenden Stäbchenkeime, widerstandsfähiger die Kokken und mit der stärksten Temperaturresistenz ausgestattet die Sporenbildner.
3. daß der Effekt der Keimreduktion durch trockenes Erhitzen und durch Gefriertrocknung nicht allein durch Keimvernichtung eintritt, sondern teilweise auch durch eine Wachstumshemmung der Bakterien verursacht wird.
4. daß mit zunehmender Lagerung gefriergetrockneter Milch die Empfindlichkeit der Keime gegenüber einer Hitzebelastung zunimmt.

Die Fragen, die sich aus diesen Beobachtungen ergeben, insbesondere auch die Frage, ob durch trockenes Erhitzen eine solche Schädigung der Keime eintritt, daß durch anschließende Lagerung des erhitzten Trockengutes in kürzerer Zeit als durch Lagerung nach Gefriertrocknung eine Sterilität eintritt,

konnte nicht mehr geklärt werden. Eine Sterilität unmittelbar im Anschluß an die Hitzebelastung konnte nicht in einem Falle erreicht werden.

Möglicherweise spielt bei den Untersuchungen mit Frauenmilch bezüglich der Temperaturreistenz der Bakterien die gleiche Schutzfunktion der Fette und Lipide eine Rolle, wie sie im Anschluß an die Untersuchungen zur Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität bereits erörtert worden ist. Eine absolute Toleranzgrenze für die Keime konnte nicht gefunden werden. Da mit 3-ständiger Hitzebelastung des Trockengutes scheinbar ein Minimalwert für die Überlebensrate der Keime erreicht ist, der sich offenbar durch weitere Belastung nur noch unwesentlich senken läßt, andererseits aber bei stärkerer Belastung mit Proteinschädigungen zu rechnen ist, wurde die 3-Std.-Belastung bei 100° C für die Proteinuntersuchungen (Elektrophoresen und Fermentuntersuchungen) nicht überschritten.

D) SCHLUSSBETRACHTUNG UND ZUSAMMENFASSUNG

Auf Grund der von NEUMANN in dem Tagungsbericht der vorletzten Gefrier-trocknungstagung (1956) zitierten Untersuchungsergebnisse, wonach Fermente und Bakterien in biologischem Material nach Gefriertrocknung eine hohe Temperaturreistenz erlangen, haben wir in Mainz gefriergetrocknete, keimhaltige Frauenmilch dem Einfluß hoher Temperaturen ausgesetzt. Zweck dieser Bemühungen sollte sein, den Hauptnachteil der Gefriertrocknung in ihrer Anwendung als Konservierungsverfahren für Frauenmilch, nämlich die zu hohe Keimzahl (Überlebensrate) nach Gefriertrocknung, durch ein zusätzliches Verfahren zu beseitigen.

In einfachen, orientierenden bakteriologischen Tests konnte nachgewiesen werden, daß in jedem Falle durch Erhitzen gefriergetrockneter Frauenmilch auf 100° C über 3 Stunden eine erhebliche Keimreduktion erzielt werden kann, im Einzelfall sogar bis auf einen Rest von 0,003% des Keimgehaltes in der Ausgangsmilch. Ein solcher Effekt kann durch Lagerung der Frauenmilch im Anschluß an die Gefriertrocknung in diesem Ausmaß erst nach sehr langer Zeit erreicht werden. Jedoch zeigte sich der Entkeimungseffekt durch trockenes Erhitzen von Milch zu Milch und von Keimart zu Keimart verschieden. Die verschiedenartigen Einflüsse der hohen Temperaturen auf die Keime der Milch im Trockenzustand konnten aus finanziellen Gründen nicht weiter verfolgt werden und bedürfen noch einer exakten Aufklärung.

Ein solches Vorgehen ist aber nur dann sinnvoll, wenn die wichtigsten Bestandteile der Frauenmilch, die Proteine, Fette und Kohlehydrate, von der Schädigung, die sich in so starkem Ausmaß an den Keimen der Milch manifestiert, nicht betroffen werden. Das Erhitzen von Trockengut muß eine ausreichende Keimvernichtung zur Folge haben, ohne daß die biologische Wertigkeit der Frauenmilch herabgemindert wird.

Die vorliegende Arbeit hatte die Prüfung möglicher Schäden an den Proteinen der Frauenmilch, die durch trockene Hitzebelastung hervorgerufen werden können, und ihre mögliche Vermeidung zur Aufgabe. In groben Tests konnte eine eindeutige Abhängigkeit der Erhitzbarkeit gefriergetrockneter Frauenmilch von der Restfeuchtigkeit festgestellt werden. Löslichkeit und Aussehen dienten als Kriterien für die beim trockenen Erhitzen auftretenden Schädigungen. Verändertes Trockengut zeichnet sich durch Unlöslichkeit und Rösterscheinungen aus. Ein Restfeuchtigkeitsgehalt von unter 1% im Trockengut gewährleistet eine Erhitzbarkeit des Trockengutes auf 100° C über mehrere Stunden. Die Bestimmung der Restfeuchtigkeit erfolgte gravimetrisch. Eine exakte Festlegung der Restfeuchtigkeitsgrenze war unter den gegebenen Verhältnissen nicht möglich, da die gravimetrische Bestimmungsmethode bei Restwassergehalten von unter 1% eine genaue Bestimmung nicht mehr gestattet. Das Trockengut wird stark hygroskopisch und zeigt auf der Mikrowaage rasch wechselnde Gewichtszunahme. Die Methode erlaubt keine Rückschlüsse auf die Wasseraufnahme (Redhydratation) aus der Atmosphäre während der notwendigen Lagerung der Meßproben im Exsikkator vor jeder Einwaage. Die Voraussetzungen zur titrimetrischen Restwasserbestimmung nach FISCHER waren nicht gegeben. Somit mußte bei der Angabe der für eine trockene Hitzebelastung kritischen Grenze von unter 1% Restfeuchtigkeit die Genauigkeit eine Einschränkung erfahren.

In vergleichenden papierelektrophoretischen Untersuchungen wurde der Einfluß der Wärme auf Proteine der Frauenmilch in den drei Zustandsformen, der Nativmilch, der gefriergetrockneten und der trocken erhitzten Frauenmilch studiert (Methode nach GRASSMANN und HANNIG für Blutserum). Es waren erhebliche methodische Schwierigkeiten zu überwinden, weil der Zustand der Fette und Lipide in ihrem Verhältnis zu den Proteinen in den Zustandsformen der Frauenmilch sehr unterschiedlich in Erscheinung tritt. Ein experimenteller Vergleich ist erst dadurch gelungen, daß es möglich wurde, die gesamten Proteine der Frauenmilch, auch die strukturgebundenen, in echte wässrige Lösung überführen und quantitativ gewinnen zu können. Dadurch konnten die bei den Untersuchungen sehr störend wirkenden Fette und Lipide von den Proteinen

getrennt werden. Es ergaben sich kaum Unterschiede im Verhalten der Proteine einer 3 Stunden lang bei 100° C trocken erhitzten Milchprobe gegenüber entsprechenden Proben aus gefriergetrockneter und nativer Milch. Mit dem gelegentlichen Verschwinden der kleinen Zwischenfraktion d zugunsten einer geringfügigen Annäherung der II. Hauptfraktion an die Fraktion I und dem Auflaufen der kleinen Vorfraktionen a, b und c zu einer Vorfraktion im Zusammenhang mit einer kaum erkennbaren Verbreiterung der Basis der ersten Hauptfraktion sind die zu beobachtenden geringfügigen Verschiebungen im Gesamtbild des Elektropherogramms erschöpfend erwähnt. Diese nicht obligat nach trockenem Erhitzen auftretenden Erscheinungen im Elektropherogramm lassen sich zahlenmäßig wegen der Schwankungsbreite der Methode nicht mehr sicher erfassen.

Mit dem auf papierelektrophoretischem Wege gefundenen Ergebnis einer weitgehenden Thermostabilität der Frauenmilchproteine gegenüber trockener Wärmebelastung waren feinere Proteinveränderungen noch nicht ausgeschlossen. Über subtilere Proteinveränderungen gibt die Elektrophorese nicht genügend Auskunft. Die Aufdeckung feinerer Proteinveränderungen gelingt besser durch Prüfung der Funktion von Wirkstoffen, die als Indikatoren eine Proteinschädigung eher anzukündigen in der Lage sind als das Verhalten des Gros der Proteine im Elektropherogramm. Solche Wirkstoffe boten sich zur Prüfung auf feinere Proteinschädigungen in Gestalt der Fermente an. Der Beweis, daß Fermente ihre Funktion einbüßen, bevor elektrophoretische Veränderungen am Gesamtprotein in erheblichem Maße in Erscheinung treten, daß also in der Fermentfunktionsprüfung eine empfindlichere Methode zur Fahndung nach Proteinveränderungen gegeben ist, ließt sich durch Kochversuche erbringen. Nach 15 sec waren die Veränderungen, die durch feuchtes Erhitzen hervorgerufen wurden, im Elektropherogramm deutlich wahrnehmbar, die Identifizierung der einzelnen Proteinfractionen im Vergleich zur Nativmilch noch ohne Schwierigkeit möglich. Dagegen büßten die untersuchten Fermente mit Beginn der elektrophoretisch erkennbaren Veränderungen ihre Funktion praktisch vollständig ein. Die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses wurde dadurch gewährleistet, daß die Untersuchungen jeweils an gleichen Milchmengen (5 ml) durchgeführt wurden, wodurch eine gleichmäßige Wärmezufuhr zum Untersuchungsmaterial in der Zeiteinheit garantiert wurde und das Maß der beobachteten Schädigungen an Protein und Fermenten als reine Funktion der Zeit für den schädigenden Einfluß in Erscheinung tritt, unabhängig von der Menge (1 ml Milch benötigt zur Erhöhung der Temperatur um 1° C eine Wärmezufuhr von ungefähr 1 cal).

In vergleichenden Fermentuntersuchungen der drei Zustandsformen der Frauenmilch, in der Nativmilch (N), der gefriergetrockneten Milch (T) und in der 3 Stunden lang auf 100° C trocken erhitzten Frauenmilch (T3) wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase, der Milchsäuredehydrogenase (MDH) und der Glutaminsäure-Oxalelessigsäure-Transaminase (GOT) geprüft.

Die Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität erfolgte in modifizierter Methodik nach GIRI, die dazugehörige Phosphatbestimmung mit Hilfe der Mikromethode von LOHMANN und JENDRASSIK. Die Modifizierung der Methode nach GIRI erwies sich als notwendig, weil ein Großteil der Frauenmilchproteine sich mit dem angegebenen Fällungsmittel nicht vollständig niederschlagen ließ (Trichloressigsäure), eine Erfahrung, die anderen Autoren ebenfalls geläufig ist. Eine zufällig entdeckte Fällungsmöglichkeit mit Hilfe von Ammoniummolybdat in 5n-Schwefelsäure, des Reagenz', welches zur Phosphatbestimmung verwendet wurde, lieferte die Voraussetzung zur Anwendung der Bestimmungsmethode von GIRI als zuverlässiges Bestimmungsverfahren für die alkalische Phosphataseaktivität. Das Fällungsverfahren wurde standardisiert und in seinem Mechanismus aufgeklärt. Eine ganze Reihe von methodischen Einzelfragen ergab sich aus den Bemühungen um einen exakten Vergleich der Fermentaktivitäten in den drei Zustandsformen der Frauenmilch, die alle zu lösen waren, bevor in kleineren Reihenuntersuchungen eine Aussage über das tatsächliche Verhalten der Fermente nach trockenem Erhitzen möglich wurde.

Die ersten Versuche mit nichtpräparierter Frauenvollmilch zeigten, daß diese zur vergleichenden Untersuchung nicht geeignet ist. Die Milch setzt sich im Bestimmungsansatz in zwei Phasen ab, in eine wässrige Phase unten und in eine Phase mit Rahmbestandteilen oben. Nach den Untersuchungen von MORTON an Kuhmilch befinden sich rund 40% der alkalischen Phosphatase im Rahm, der größere Rest in der Magermilch. Die Verhältnisse liegen, wie eigene Untersuchungen bestätigten, bei der Frauenmilch ähnlich. Dieser Umstand führte zu einer erheblichen Ungenauigkeit bei der Phosphatbestimmung, mit deren Hilfe die Aktivität der alkalischen Phosphatase gemessen wurde: Meßproben, die ohne Irritation der Ansatzflüssigkeit aus der Tiefe entnommen wurden, zeigten einen geringeren Phosphatgehalt, als dies bei der Entnahme aus dem aufgeschüttelten Reaktionsansatz der Fall war. Dieser Befund ist so zu erklären, daß der Teil des Fermentes, der in der Rahmschicht beherbergt ist, unter erschwerten Diffusionsbedingungen für Substrat und Reaktionsprodukt funktioniert. Durch Schütteln der Ansatzflüssigkeit kann zwar eine annähernd gleichmäßige Verteilung von Substrat und Reaktionsprodukt über die gesamte Ansatzflüssigkeit erreicht werden, aber dadurch gelingt noch kei-

ne sichere Aussage über die tatsächliche Leistungsfähigkeit des Teiles an Ferment, der sich im Rahm befindet und durch diesen in seiner Funktion gehemmt wird. Infolgedessen wurde die nichtpräparierte Frauenmilch als Untersuchungsobjekt fallengelassen.

Untersuchungen mit gereinigter Magermilch, die durch Zentrifugieren und Filtrieren durch gewöhnliches Laborfilter gewonnen wurde, zeigten sehr deutlich, daß die alkalische Phosphatase in den drei Zustandsformen der Frauenmilch in sehr verschiedenem Aktivierungsgrad vorliegt. In den Chargenvergleichen konnte eine gesteigerte Aktivität in der Magermilch nach Gefriertrocknung festgestellt werden. Dabei erfolgte die Steigerung der Aktivität von der Nativmilch zur gefriergetrockneten unterschiedlich, während der Aktivitätsverlust von der gefriergetrockneten zur trocken erhitzten Milch gleichmäßig vor sich ging. Dieser Befund bietet keine Besonderheiten, seitdem MORTON die enge Beziehung der alkalischen Phosphatase zu einem Lipoidkomplex in der Kuhmilch erkannt und in mehreren Arbeiten einer exakten Prüfung unterzogen hat. Die alkalische Phosphatase kommt in der Milch nicht echt gelöst vor, sondern sie ist eng vergesellschaftet mit einem isoliert wasserunlöslichen Lipoidkomplex, der ein Struktur- und Formelement der Milch darstellt. MORTON nennt solche Formelemente "Milchmikrosomen".

Bei der uns zur Verfügung stehenden Gefriertrocknungsanlage 08 G der Fa. LEYBOLD konnte der erforderliche Restwassergehalt von unter 1%, der für eine langfristige Erhitzbarkeit des Trockengutes über Stunden unbedingt Voraussetzung ist, nur dadurch erreicht werden, daß bei der Nachtrocknung eine Temperatur von 50° C angewandt wurde. Die Lipide der Frauenmilch beginnen aber z. T. bei 40° C in den flüssigen Aggregatzustand überzugehen und sind bei 50° C zu einer zähen Masse verflüssigt. Die Verflüssigung geschieht umso mehr, wenn das Trockengut auf 100° C erhitzt wird. Es ist ohne weiteres denkbar, daß der beobachtete Aktivierungseffekt in der Magermilch nach Gefriertrocknung durch eine Dissoziation von Fermentprotein und Lipoidkomplex während der Nachtrocknung bei 50° C erfolgt ist. Andererseits ist es möglich, daß die beim Erhitzen flüssigen Fette und Lipide das gesamte Trockengut mit einem Lipoid-Fettfilm überziehen, woraus nach Erkalten und Erstarren eine enge Adsorption der Lipide und Fette an die Proteine resultiert. Letzteres könnte für einen Teil des Fermentaktivitätsverlustes verantwortlich sein, indem es zu einem Cachierungseffekt von Proteinen durch Lipide und Fette kommt.

Aus diesen Überlegungen und Befunden ergab sich die Notwendigkeit, in allen drei Zustandsformen der Frauenmilch eine vollständige Aktivierung der Fer-

mente herbeizuführen, um in allen Teilen des Untersuchungsmaterials einen gleichmäßigen Aktivierungsgrad zu erzielen. Denn nur auf diesem Wege lassen sich Aussagen über etwaige Einschränkungen der Funktionstüchtigkeit von Fermenten machen, die von zufälligen und nicht kontrollierbaren Einflüssen der geschilderten Art unabhängig sind. Mit Hilfe von Butanol, mit dem MOR-TON eine Freisetzung der alkalischen Phosphatase gelungen ist, und zusätzlicher Verwendung von Chloroform und Aceton konnte ein präparatives Verfahren entwickelt werden, welches es ermöglicht, die gesamten Proteine der Frauenmilch in echte wässrige Lösung überführen zu können. Eine weitere Steigerung der Fermentaktivität war nach Abschluß dieses Verfahrens nicht mehr möglich. Die Bemühungen um eine "totale Fermentaktivierung" haben als Ergebnis eine klare, serumähnliche Flüssigkeit erbracht, welche alle Proteine, auch die strukturgebundenen, in echter wässriger Lösung enthält und einen Vergleich auf volumemäßiger Basis gestattet.

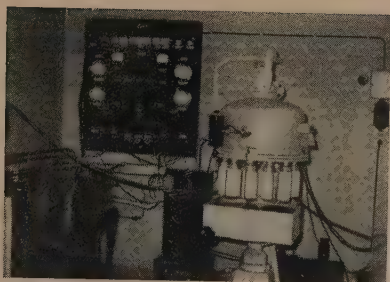
Im endgültigen Vergleich erwies sich die Gefriertrocknung allein als unschädlich für die alkalische Phosphatase. Die Erhitzung des Trockengutes mit einem Restwassergehalt von unter 1% auf 100° C über 3 Stunden setzte die Aktivität der alkalischen Phosphatase um knapp ein Fünftel herab.

Ausgehend von der Tatsache, daß die Frauenmilch durch apokrine Sekretion entsteht, d.h. durch Abschnüren und proteolytischen Zerfall eines Teiles der Milchdrüsenzelle, lag die Vermutung nahe, daß neben der alkalischen Phosphatase und vielen anderen in der Frauenmilch längst bekannten Fermenten auch noch Zellfermente in der Frauenmilch vorhanden sein müssen, die der Untersuchung bisher nicht zugänglich waren. Mit der vollständigen Freisetzung der Proteine in klarer wässriger Lösung war erstmalig die Voraussetzung zur Anwendung enzymatischer Bestimmungsmethoden auf die Frauenmilch nach dem Prinzip des "optischen Tests" von WARBURG gegeben. In Chargenvergleichen wurde die Aktivität der Milchsäuredehydrogenase und der Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase nach den in der Klinik geläufigen Methoden zur Herzinfarktdiagnostik aus dem Blutserum geprüft (Methoden von BÜCHER für die MDH und von LADUE, WROBLESKI und KARMEN für die GOT).

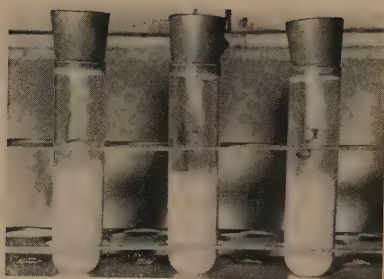
Im Chargenvergleich erweist sich die Milchsäuredehydrogenase gegen trockenes Erhitzen auf 100° C über 3 Stunden mit einem durchschnittlichen Aktivitätsverlust um fast die Hälfte als hitzeempfindlicher als die Glutaminsäure-Oxalessigsäure-Transaminase mit knapp einem Drittel Aktivitätsverlust.

ZUSAMMENFASSUNG

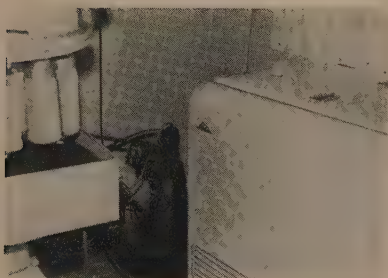
1. Die Gefriertrocknung allein bleibt ohne Einfluß auf die Proteine der Frauenmilch.
2. Nach trockenem Erhitzen gefriergetrockneter Frauenmilch mit einem Restwassergehalt von unter 1% auf 100° C über 3 Stunden können elektrophoretisch kaum Proteinveränderungen nachgewiesen werden. - Die empfindlicheren Fermente erleiden durch trockenes Erhitzen eine begrenzte Schädigung.
3. Die Protein- und Fermentschädigungen infolge trockenen Erhitzens sind gering im Vergleich zu den Veränderungen, wie sie nach kurzfristigem feuchtem Erhitzen zu beobachten sind.
4. Die Überlegungen und Befunde um die enge Verbindung zwischen Fermenten und Strukturelementen der Milch zeigen, daß es bei spezieller Anwendung der Gefriertrocknung auf biologisches Material nicht gleichgültig ist, bei welcher Temperatur die Nach Trocknung vorgenommen wird.
5. Es besteht eine Abhängigkeit der Erhitzbarkeit des Trockengutes von der Restfeuchtigkeit. Je geringer die Restfeuchtigkeit, umso ausgiebiger kann das Trockengut erhitzt werden. Unter besseren Gefriertrocknungsbedingungen wird es offenbar möglich, eine noch wesentlich höhere Temperaturresistenz der Frauenmilchproteine zu erzielen. Vielleicht erlaubt ein extrem niedriger Restwassergehalt ein Vordringen in einen Temperaturbereich, in dem eine sichere Sterilisierung keimhaltigen biologischen Materials durch trockenes Erhitzen ohne wesentliche Proteinschädigung möglich ist.



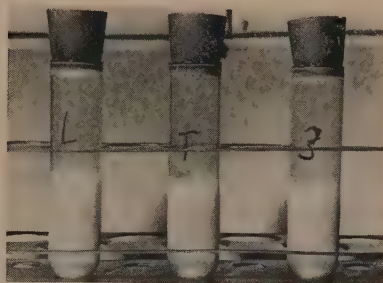
(Abb. 1a)



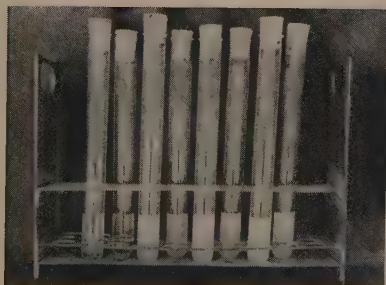
(Abb. 15a)



(Abb. 1b)



(Abb. 15b)



(Abb. 6)



(Abb. 15c)

I

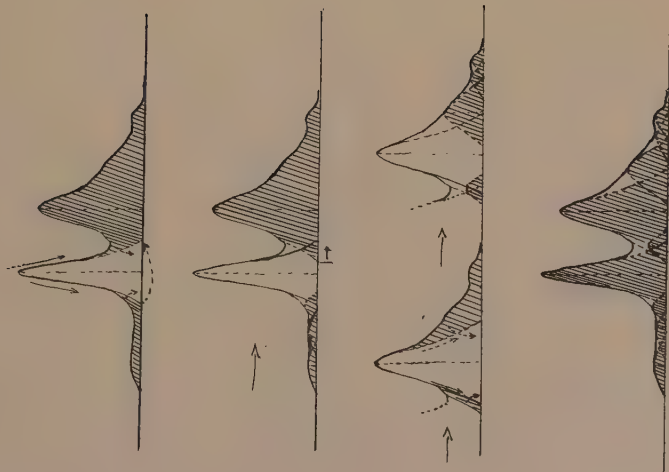


Abb. 2 a

II

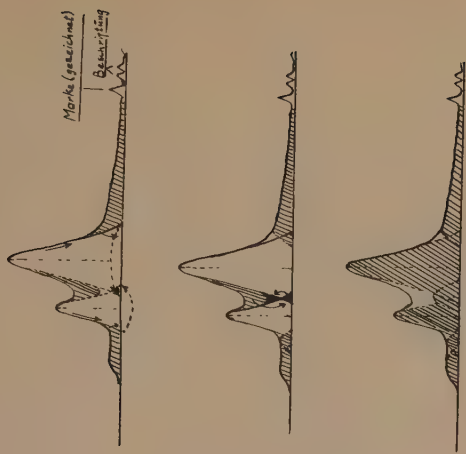


Abb. 2 b

VII

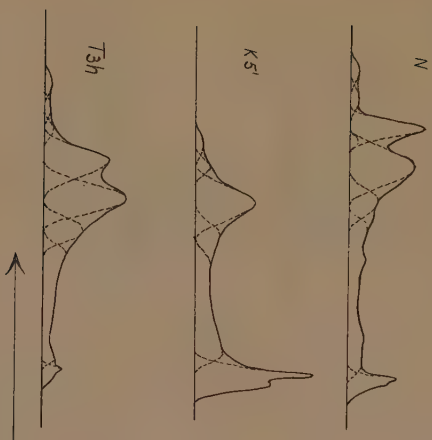


Abb. 3

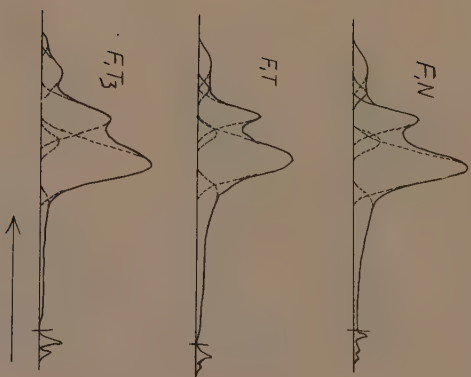


Abb. 4

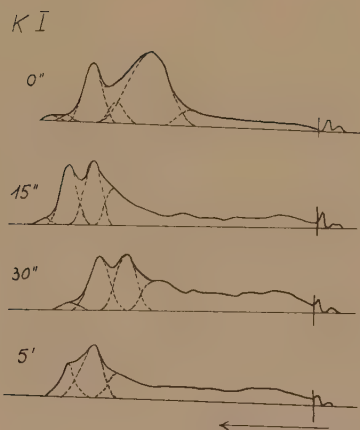


Abb. 5

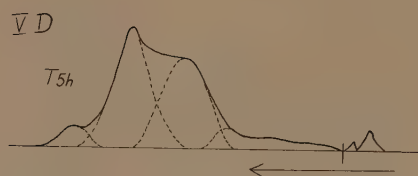


Abb. 7

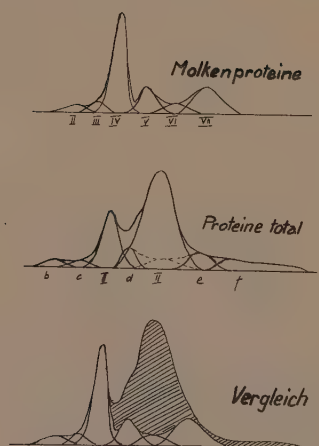


Abb. 8

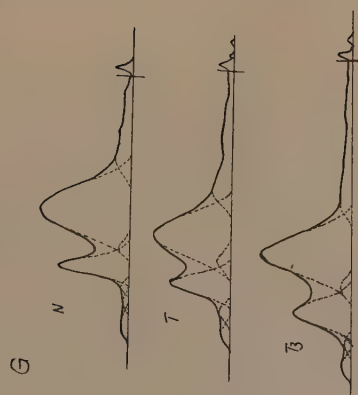


Abb. 9

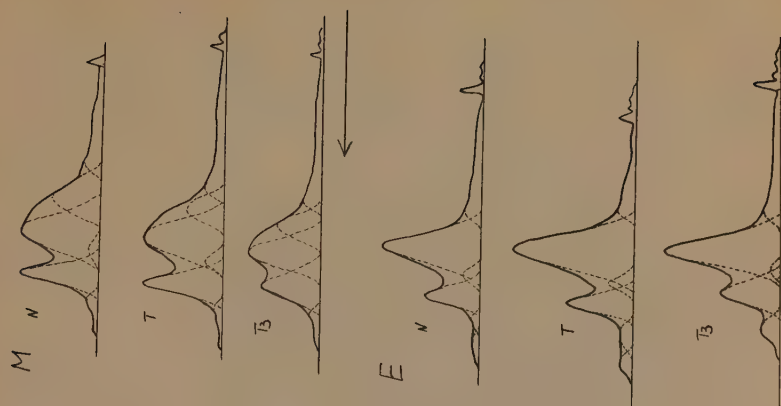


Abb. 10

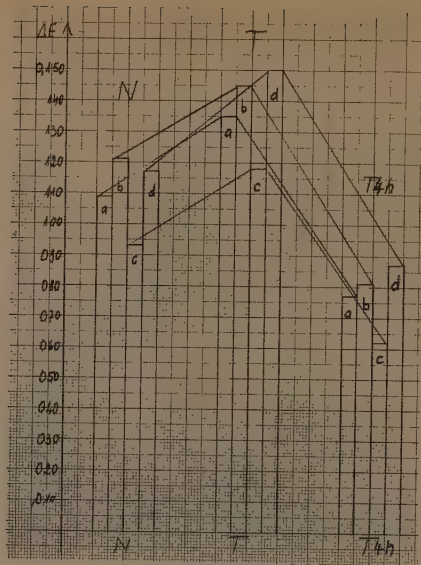


Abb. 11

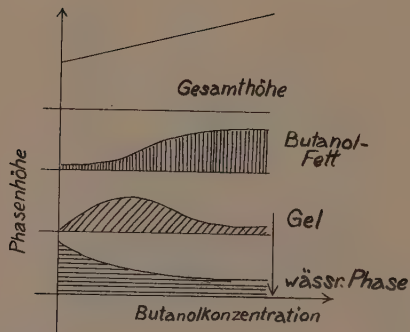


Abb. 12

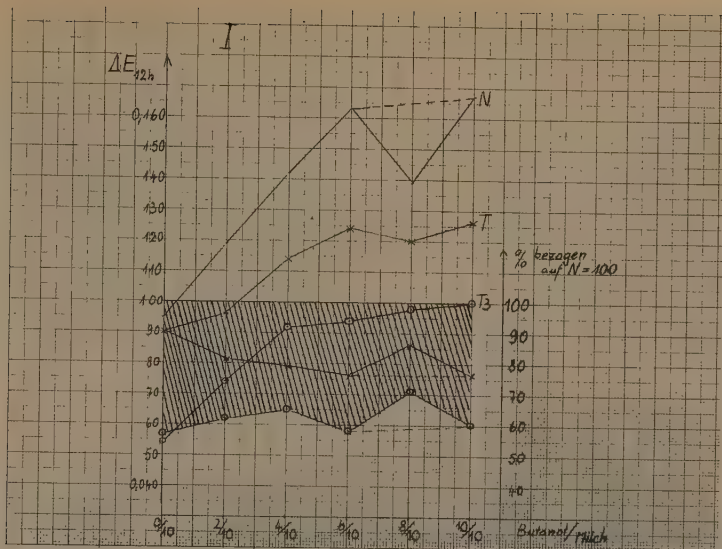


Abb. 13 a

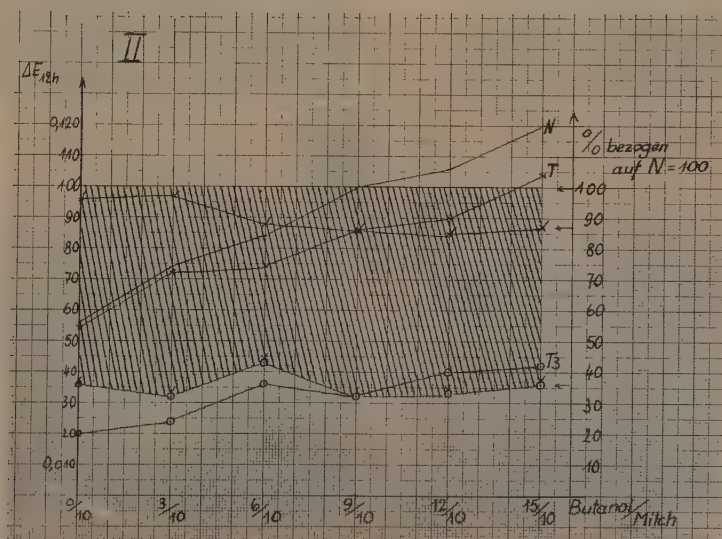


Abb. 13 b

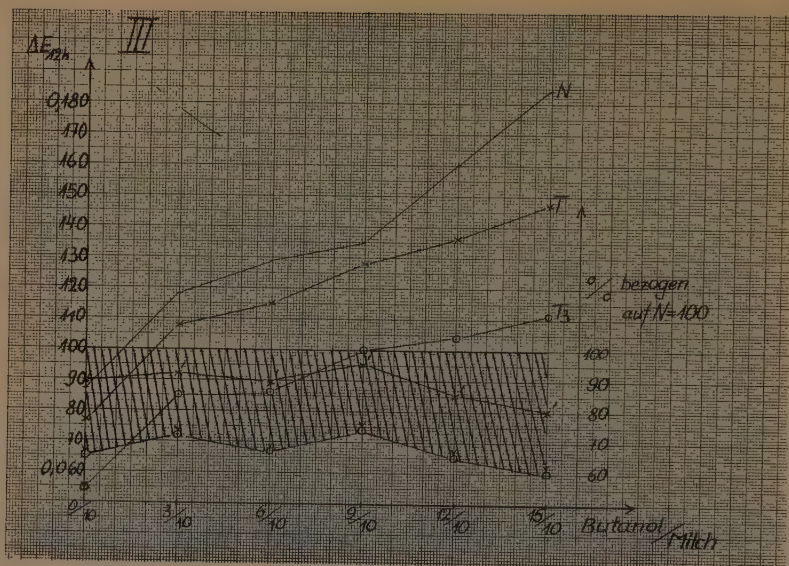


Abb. 13 c

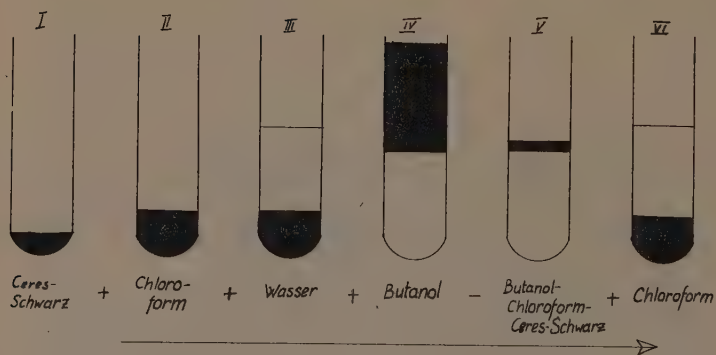


Abb. 14



(Abb. 15d)



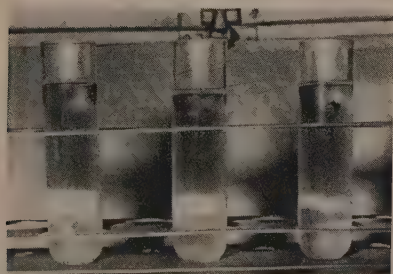
(Abb. 15g)



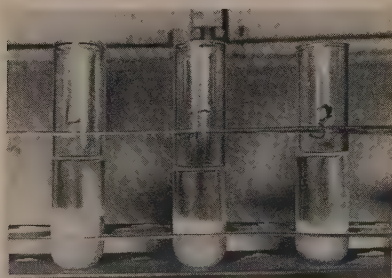
(Abb. 15e)



(Abb. 15h)



(Abb. 15f)



(Abb. 15i)



(Abb. 15k)

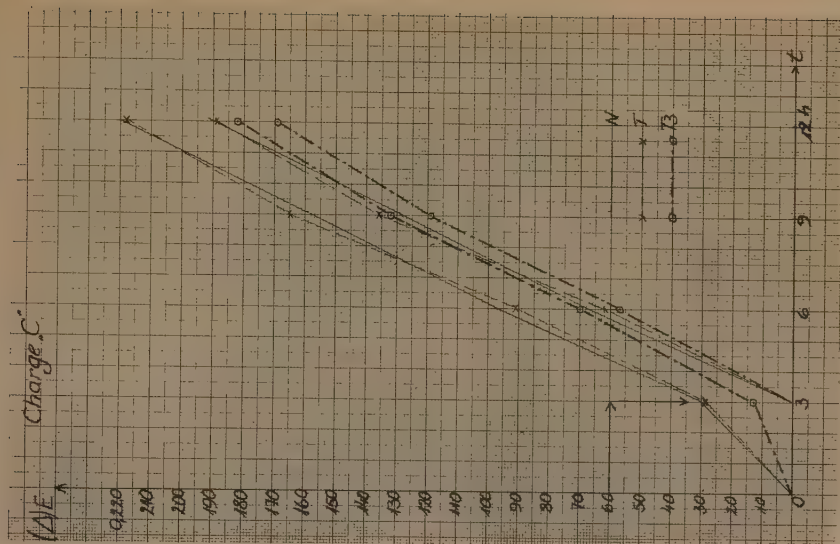


Abb. 17

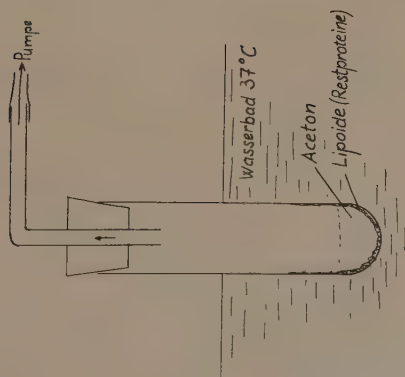


Abb. 16

Change C, Teil N

$$E = \frac{1}{2} a_m (h_{75} + 126,95)$$

$$w_{0,9} q_{0,9} = 0,32 \times 50$$

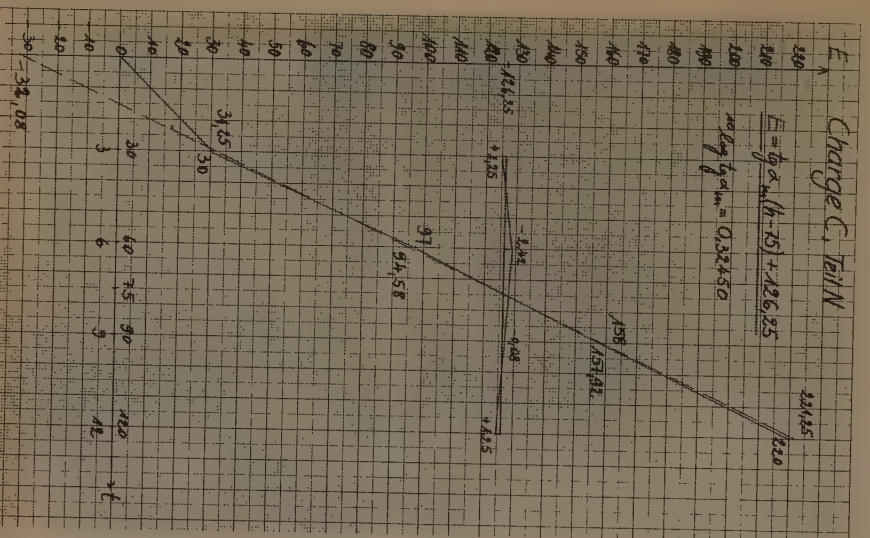


Abb. 18

Change C, mittlere Geraden

$$N: \frac{E}{a_m} = \frac{1}{2} a_m (h_{75} + 126,95)$$

$$w_{0,9} q_{0,9} = 0,32 \times 50$$

$$E = \frac{1}{2} a_m (h_{75} + 126,95)$$

$$w_{0,9} q_{0,9} = 0,32 \times 50$$

$$E = \frac{1}{2} a_m (h_{75} + 126,95)$$

$$w_{0,9} q_{0,9} = 0,32 \times 50$$

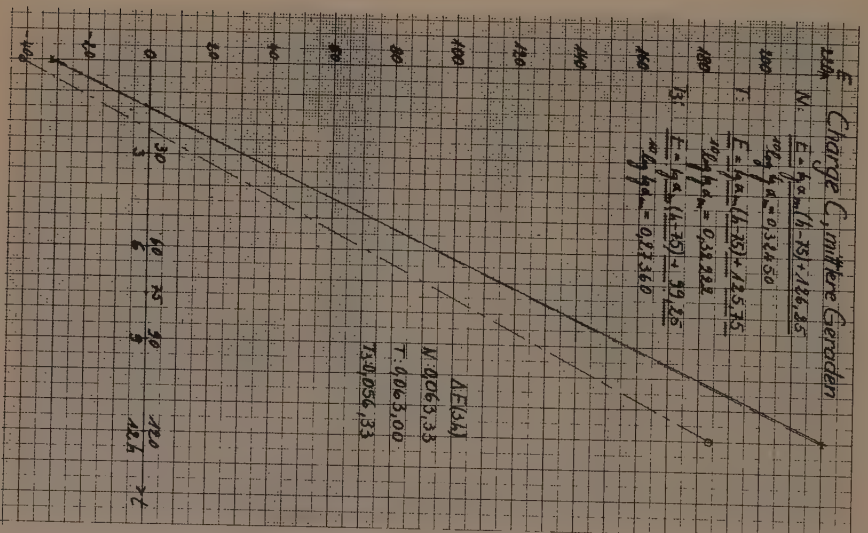


Abb. 19

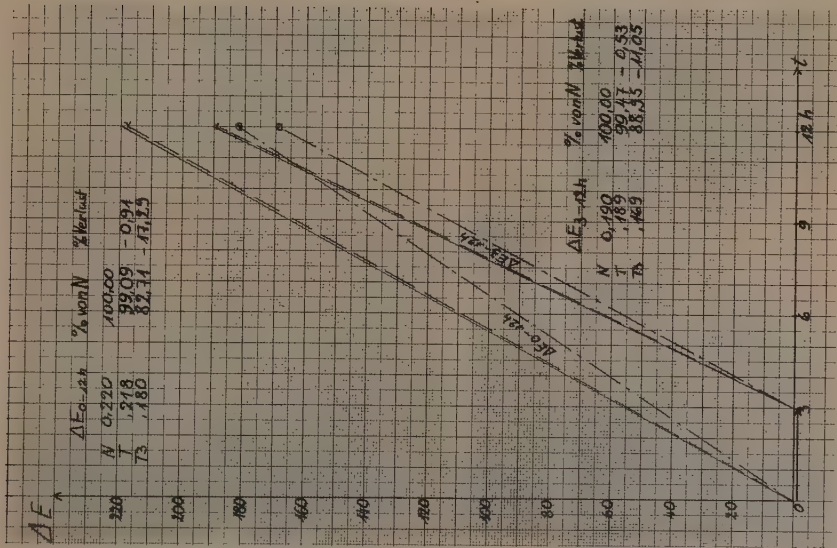


Abb. 20

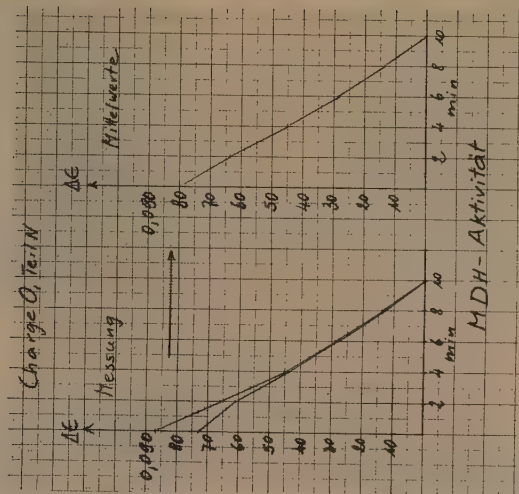


Abb. 21

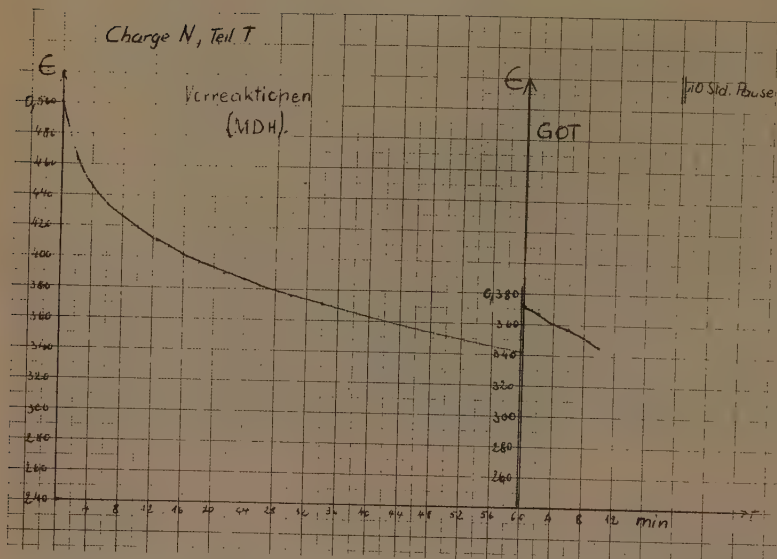


Abb. 22

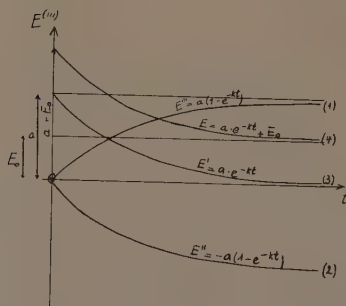
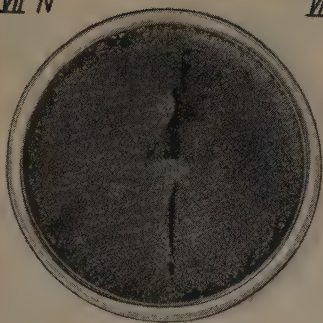


Abb. 23

VII N

VII T



(Abb. 24a)

J



(Abb. 25a)

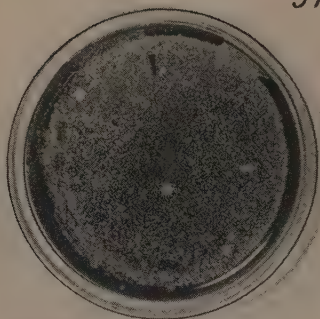
1½h VII 1

2h VII 2



(Abb. 24b)

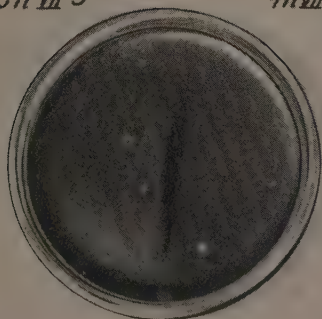
JT



(Abb. 25b)

3h VII 3

4h VII 4



(Abb. 24c)

JT3



(Abb. 25c)

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) SAGER, C. A., Frauenmilch-Konservierung durch Gefriertrocknung (Monographie), Beihefte zum Archiv f. Kinderheilkunde, 37. Heft, 1958, S. 1 u. 2.
- (2) MAYERHOFER, E., u. E. PRIBRAM, Mschr. Kinderhk. 1, 59 (1910).
- (3) KAYSER, M. E., Med. Klin. 34, 45 (1938).
- (4) SAGER, C. A., Monographie (1958), S. 10-11 (vgl. (1)).
- (5) SAGER, Monographie (1958), S. 17.
- (6) ROEDER, G., loc. cit. in SAGER, Monographie (1958).
- (7) HOFFMANN-Essen, Tagungsbericht der Leiter und Leiterinnen von Frauenmilchsammelstellen, 17./18. Mai 1958, in Essen.
- (8) KAYSER, K., Österr. Z. Kinderheilk. 11, 232 (1955).
- (9) KAYSER, M. E., loc. cit. in SAGER, Monographie (1958), S. 16.
- (10) SCHLOSSMANN, A., CATEL und ZENKER, FREUDENBERG, MARTIN DU PAN, KELLER, loc. cit. SAGER, Monographie (1958), S. 14.
- (11) ADAM, CATEL, ROOS und KINDLER, ROOS, RUSS, H. THOMAS, DRESEL, loc. cit. SAGER, Monographie (1958), S. 15.
- (12) LINNEWIEH, MARGET, ARNOLD, POETSCHKE, BINDEWALD, ROOS und KINDLER, H. THOMAS, loc. cit. SAGER, Monographie (1958), S. 15.
- (13) EISLEB, OCKLITZ und SCHMIDT, loc. cit. SAGER, Monographie (1958), S. 16.
- (14) FREUDENBERG, SPRÖSSIG, K. KAYSER, loc. cit. SAGER, Monographie (1958), S. 16.
- (15) FLOSDORF und MUDD, loc. cit. SAGER, Monographie (1958), S. 18.
- (16) CATEL, W., Dtsch. Z. Verdauungs- und Stoffwechselkrh. 1, 129 (1938/39).
- (17) CATEL, W., Jb. Kinderheilk. 134, 278 (1932).
- (18) CATEL, W., Mschr. Kinderhk. 81, 334 (1939/40).
- (19) CATEL, W., und J. ZENKER, Dtsch. med. Wschr. 1940/II, 959.
- (20) CATEL, W., PENDL, J. und O. SCHIFF, Dtsch. med. Wschr. 1953, 1337.
- (21) BESSAU, G., Physiologie, Pflege und Ernährung des Neugeborenen, in STOECKEL, W., Lehrbuch d. Geburtshilfe, 7. Aufl. 1943, G. Fischer-Verlag, Jena.
- (22) BAYER, W., Arch. Kinderhk. 120, 189 (1940).
- (23) MAYERHOFER, E., Österr. Z. Kinderhk. 10, 127 (1954).
- (24) LIEBE, S. und U. ECKHOLDT, Kinderärztl. Praxis, So. 1953, loc. cit. SAGER, Monographie (1958), S. 4.

- (25) MAYERHOFER, E. und E. PRIBRAM, Mschr. Kinderhk. 1, 59 (1910).
- (26) MOMMSEN, Med. Klinik 33, H. 47 (1937), loc. cit. SAGER, Monographie (1958), S. 13.
- (27) MÜLLER, E., Arch. Kinderhk. 119, 112 (1940).
- (28) PEIPER, A., Kinderärztl. Praxis 50, 223 (1950).
- (29) Ders., Kinderärztl. Praxis 19, 542 (1951).
- (30) THOMAS, E., Mschr. Kinderhk. 98, 449 (1950).
- (31) FREUDENBERG, E., Zur Verdauungsphysiologie des Säuglings (Fettverdauung), Zschr. Kinderhk. 43, 437 (1927).
- (32) FINKELSTEIN, H., Therap. Monatsh. 21, 508 (1907).
- (33) EISLEB, H., Kinderärztl. Praxis 22, 525 (1954).
- (34) FELDWEIG, P., und I., Klin. Wschr. 18, 936 (1939).
- (35) KAYSER, M. E., Mschr. Kinderhk. 51 (1931).
- (36) MÜLLER, J., Kinderärztl. Praxis 22, 527 (1954).
- (37) PLETTENBERG, SAUERBREI, Arch. Kinderhk. 151, 133 (1955).
- (38) KARTE, H., Mschr. Kinderhk. 105, 451-461 (1957).
- (39) MÜLLER, J., Vortrag auf der Arbeitstagung der Leiter und Leiterinnen von Frauenmilchsammelstellen, 7./9. Mai 1954, in Pforzheim.
- (40) SAGER, C. A., Monographie (1958), S. 18.
- (41) CATEL, W., J. PENDL und O. SCHIFF, Dtsch. med. Wschr. 1953, 1337.
- (42) KÖTTGEN, U., E. BRAUN und V. FRIEDBERG, Dtsch. med. Wschr. 1955, 923.
- (43) HOFMANN, K. A. und U. R., Anorganische Chemie, 13. Aufl. Verl. Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, 1949, S. 288.
- (44) CATEL, Geleitwort zu SAGER, Monographie (1958).
- (45) NEUMANN, K. H., Chemie-Ingenieur-Technik, Jg. 29, 1957, 267-275, Tagungsbericht.
- (46) SAGER, C. A., Monographie (1958), S. 82.
- (47) KARTE, H., Vortrag auf der Arbeitstagung der Leiter und Leiterinnen von Frauenmilchsammelstellen, 17./18. Mai 1958, in Essen.
- (48) GRASSMANN, W. und K. HANNIG, Z. physiolog. Chemie 290, 1 (1952).
- (49) MICHAELIS, L., Biochem. Z. 234, 139 (1931).
- (50) GRASSMANN, W., und K. HANNIG, Z. physiol. Chemie 293, 32 (1953), S. 34.
- (51) TURBA, F., und H. J. ENENKEL, Naturwiss. 37, 93 (1950).
- (52) MORTON, R. K., Biochem. J. 57, 231 (1954).
- (53) KARTE, H., Mschr. Kinderhk. 105 (1957), S. 451-461, 453, 452.
- (54) RAUEN, Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag 1956, S. 981.
- (55) FLASCHENTRÄGER, B. und E. LEHNARTZ, Physiologische Chemie, Lehr- und Handb., Bd. II, Zweiter Teil, Bandteil b, S. 408.

- (56) GIRI, K. V., H. 243, 57 (1936).
- (57) SAGER, C. A., Monographie (1958), S. 42.
- (58) MORTON, R. K., Biochem. J. 55, 793 (1953).
- (59) COLOWICK and KAPLAN, Methods in Encymology, Bd. II. S. 533.
- (60) D'ANS, J. und E. LAX, Taschenbuch f. Chemiker und Physiker, 2. Aufl., Springer-Verlag 1949, S. 1592.
- (61) LOHMANN und JENDRASSIK, Biochem. Z. 178 (1926) 419, loc. cit. in HINSBERG und LANG, Medizinische Chemie, 2. Aufl., Verlag Urban und Schwarzenberg, München-Berlin, 1951, S. 56/57.
- (62) KARTE, H., Mschr. Kinderhk, 105 (1957), S. 456.
- (63) HOFMANN, K. A. und U. R., Anorganische Chemie, 1949, S. 578 (Vgl. (43)).
- (64) KIERMEIER, F., Biochem. Z. 318, 275 (1948).
- (65) STARK, G. und W. JUNG, Arch. Gynäkol. 187 (1956), S. 402-403.
- (66) SAGER, C. A., Monographie (1958), S. 54.
- (67) MORTON, R. K., Biochem. J. 55, 793 (1953).
- (68) KAY, H. D. und W. R. GRAHAM, J. Dairy Research 5, 63 (1933), loc. cit. in COLOWICK and KAPLAN, Methods in Encymology, Bd. II, S. 533.
- (69) LEHNARTZ, E., Chemische Physiologie, Springer-Verlag, 10. Aufl., 1952, S. 316.
- (70) Ders., Chemische Physiologie, S. 422 (Vgl. (69)).
- (71) Ders., Chemische Physiologie, S. 421 (Vgl. (69)).
- (72) SIRK, H., Mathematik für Naturwissenschaftler und Chemiker, Steinkopf-Verlag, Dresden und Leipzig, 1957, S. 95.
- (73) DEMETER, K. J., loc. cit. in HALLMANN, L., Bakteriologie und Serologie, 2. Aufl., Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, S. 709.
- (74) MacCONKEY, Difco-Manual, Ninth Edition, 1953, S. 131.
- (75) FRIEDBERG, V. und K. STEINHEUER, Dtsch. med. Wschr. 1959, S. 792.

LEBENS LAUF

Am 16. Februar 1930 wurde ich als Sohn von Matthias Steinheuer, Gutsverwalter, und Anna, geb. Riß, in Oberemmel, Kreis Saarburg, geboren. Die Volksschule in Oberemmel besuchte ich von Ostern 1936 bis Ostern 1940, das Staatliche Max-Planck-Gymnasium in Trier von Ostern 1940 bis Herbst 1949. Am 4. Juli 1949 legte ich an der letztgenannten Schule die Reifeprüfung mit gutem Erfolg ab.

Zum Wintersemester 1949/50, am 25. Oktober, ließ ich mich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz zum Studium der Chemie immatrikulieren. Zum folgenden Semester, im Sommer 1950, erfolgte eine Umschreibung in die Medizinische Fakultät zum Studium der allgemeinen Medizin ebenfalls an der Mainzer Universität, wo ich mein gesamtes Studium absolvierte.

Meine vorklinischen Semester beendete ich am 3. November 1952, als ich die ärztliche Vorprüfung mit sehr gutem Erfolg bestanden hatte. Nach Beendigung meiner klinischen Studien legte ich das ärztliche Examen am 18. Oktober 1955 ebenfalls mit dem Urteil "sehr gut" ab. Mit Erfüllung der Vorschriften der Bestallungsordnung für Ärzte wurde mir mit Wirkung vom 15. März 1957 durch das Ministerium des Inneren der Landesregierung Rheinland-Pfalz die Approbation als Arzt zuerkannt.

Während meiner Pflichtassistentenzeit war ich vom 15. Dezember 1955 bis 30. September 1956 an der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität in Mainz (Prof. Keining) tätig. Anschließend wechselte ich mein Betätigungsfeld und ging an die Universitäts-Frauenklinik (Prof. Schwalm). Dort wurde ich mit der technischen Durchführung der Gefriertrocknung von roher Frauenmilch betraut und hatte reichlich Gelegenheit, die organisatorischen und wissenschaftlichen Probleme im Zusammenhang mit der Rohkonservierung von Frauenmilch kennenzulernen. Die Einsicht in die vielseitige Problematik der Frauenmilchkonservierung und ihre Bedeutung für die Säuglingsernährung wurde für mich bestimmend zur experimentellen Bearbeitung eines speziellen wissenschaftlichen Problems der Rohkonservierung von Frauenmilch durch Gefriertrocknung und Erhitzen des Trockengutes zum Zwecke einer notwendigen zusätzlichen Entkeimung der Ausgangsmilch.

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis meiner Bemühungen. Bis zu Beginn dieses Jahres war ich noch mit den experimentellen Arbeiten zu meiner Dissertation beschäftigt. Mit der Erlangung der ärztlichen Approbation habe ich bei Prof. Schwalm meine Facharztausbildung für Gynäkologie und Geburtshilfe begonnen.

GESAMTHERSTELLUNG:
DITTERS BÜRODIENST, MAINZ, Augustinerstraße 64-66

